

**LEKTINBINDUNGSSTELLEN
UND LEKTINAUFNAHMESTUDIEN
AM EPITHEL DER MILCHDRÜSE DER RATTE
LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE
IN VIVO- UND IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN**

Ingeborg Schinko

München 1986

Aus der Anatomischen Anstalt
(Lehrstuhl II, Vorstand Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. U. Welsch)
der Ludwig Maximilians-Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. med. H. Frick

LEKTINBINDUNGSSTELLEN UND LEKTINAUFNAHMESTUDIEN
AM EPITHEL DER MILCHDRÜSE DER RATTE
LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE
IN VIVO- UND IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ingeborg SCHINKO

aus
München

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. U. Welsch

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Hübner
Prof. Dr. F. Sinowatz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 11. 1986

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>Einleitung</u>	1
<u>Material und Methoden</u>	5
1. Material	5
2. Lichtmikroskopische Lektinhistochemie	5
2.1 Tabelle der verwendeten Lektine	6
2.2 Kryostattechnik	7
2.3 Paraplasttechnik	7
2.4 Kontrolle der Spezifität der Lektine	7
2.5 Plastik-Lichtmikroskopie und Elektronenmikroskopie an Ultradünnschnitten	8
3. In vivo-Untersuchung der Bindung und Aufnahme von WGA auf lichtmikroskopischer Ebene	8
4. In vivo-Untersuchung der Bindung und Aufnahme von WGA auf elektronenmikroskopischer Ebene	9
5. in vitro-Untersuchungen	9
5.1 Untersuchungen an isolierten Epithelzellen	9
5.2 Untersuchungen an isolierten Drüsenalveolen	11
<u>Befunde</u>	12
1. Lektinbindungsstellen während der ontogenetischen Entwicklung der Milchdrüse der Ratte (lichtmikroskopisch)	12
2. Aufnahme von WGA-FITC und Con A-FITC durch Zellen (lichtmikroskopisch)	34
3. Infusion von WGA-FITC und WGA-Ferritin in die Milchdrüse der laktierenden Ratte	37
a) WGA-FITC, fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	37
b) Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen mit WGA-Ferritin	40
4. Elektronenmikroskopische Befunde an in vitro gehaltenen Milchdrüsenzellen und an isolierten Alveolen	48
5. Licht- und elektronenmikroskopische Befunde an der Milchdrüse während der ontogenetischen Entwicklung	52
<u>Diskussion</u>	74
<u>Zusammenfassung</u>	87
<u>Literaturverzeichnis</u>	89
<u>Danksagung</u>	96
<u>Lebenslauf</u>	97



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547927_0105

EINLEITUNG

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist eine Darstellung von Lektinbindungsstellen an laktierenden und nicht laktierenden Epithelzellen der Mamma der Ratte. Gleichzeitig soll versucht werden, einen Einblick in den Umsatz der apikalen Plasmamembran dieser Zellen zu gewinnen. Damit sollen die Eigenschaften der Zellmembran dieser allgemeinbiologisch und medizinisch wichtigen Drüsenzellen charakterisiert werden.

Alle Zellmembranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, in die verschiedene Proteine eingelagert sind. Während Grundstruktur und fundamentale Eigenschaften von Membranen durch die Lipiddoppelschicht bestimmt werden, sind für viele ihrer spezifischen Funktionen hauptsächlich Proteine verantwortlich. So liegen zahlreiche Befunde vor, die dafür sprechen, daß die Kohlenhydratkomponenten von Glykoproteinen, die in den Extrazellularraum ragen, der Zelle eine Kommunikation mit ihrer Umgebung ermöglichen. Informationen, die eine Zelle mit Hilfe ihrer Glycoconjugate empfängt, sollen z.B. für Wachstum und Differenzierungsprozesse wesentlich sein (Wieser und Brunner 1983, Reutter 1984).

Für einen spezifischen Nachweis von Glykokonjugaten der Zellmembranen haben sich Lektine besonders bewährt (Nicolson 1974, Brown und Munt 1978). Einer neueren Definition entsprechend sind Lektine "proteins of nonimmunoglobulin nature capable of specific recognition and reversible binding to carbohydrate moieties of complex carbohydrates without altering the covalent structure of any of the recognized glycosyl ligands" (Kocourek and Hořejší 1983). Vorteilhafterweise lassen sich Lektine nicht nur bei chemischen oder biologischen Analysen einsetzen, sondern auch an Gewebeschnitten, so daß sich zeigen ließ, daß in einem Epithelverband komplexe und unterschiedliche Kohlehydrat-

verteilungsmuster vorkommen können. Nemanic et al. (1983) konnten z.B. Unterschiede im Lektinbindungsmuster bei verschiedenen Entwicklungsstadien von Epidermiszellen der Maus und des Menschen und Malmi et al. (1983) entsprechende Veränderungen bei der Ausreifung von Spermien der Ratte zeigen. Auch in der praktischen Medizin läßt sich die spezifische Verbindung der Lektine mit Membranzuckern ausnutzen, z.B. bei der Bestimmung von Blutgruppen, woher auch die Bezeichnung "Agglutinin" rührt, die viele Lektine tragen. Veränderungen im Muster terminaler Mono- und Oligosaccharide gealterter Erythrozyten werden von Makrophagen in Milz und Leber erkannt, was dazu führt, daß die Erythrozyten phagozytiert werden (Müller et al. 1983). Schließlich wurde wiederholt vermutet, daß sich auch normale und entartete Zellen in Hinsicht auf ihr Lektinbindungsmuster voneinander unterscheiden können, so daß sie sich in spezifischen Fällen als Tumormarker miteinsetzen lassen (Vierbuchen et al. 1981, Borisch 1984).

Mit Hilfe von Lektinen können im morphologisch-zellbiologischen Bereich unterschiedliche Untersuchungen durchgeführt werden. Einmal hat sich herausgestellt, daß sie Zelleigenschaften verändern können; so wird z.B. 1) die Endocytosetätigkeit menschlicher Lymphozyten durch Phytohämagglutinin (PHA) erhöht (Renau-Piqueras et al. 1985), außerdem haben 2) PHA und das Lektin Concanavalin A (Con A) mitogene Wirkung auf T-Lymphocyten (Einzelheiten siehe Stadler et al. 1983), oder 3) kann das Lektin Con A die Sekretion in der Mamma reversibel hemmen (Patton et al. 1980 a und b). Zum anderen eignen sich Lektine - wie bereits angedeutet - zur Analyse spezifischer Mono- oder Oligosaccharide in Membranen. Sie lassen sich daher in histo- oder cytochemischen Untersuchungen einsetzen und können dann weiterhin dank ihrer spezifischen Bindung als Membranmarker genutzt werden, wenn Transportvorgänge in Zellen hinein oder durch sie hindurch, die mit Membranverschiebungen einhergehen, beobachtet werden sollen.

Die kurz skizzierten Einsatzmöglichkeiten von Lektinen sollen in der vorliegenden Arbeit genutzt werden, um Untersuchungen an der apikalen Zellmembran von laktierenden Epithelzellen der Mamma durchzuführen. Da in laktierenden Mammaepithelzellen ein hoher Membranumsatz stattfindet, eignen sie sich besonders gut zum Studium des Membranrecycling und intrazellulärer Transportvorgänge. Bei ihrer apokrinen Sekretion werden die Milchfettkugeln von der apikalen Plasmamembran eingehüllt und gehen somit der Zelle verloren. Diesem Verlust an Zellmembran steht ein viel größerer Gewinn an Membran gegenüber, zu dem es bei der Exocytose von Caseinvesikeln kommt, wenn deren Membran in die Zellmembran eingebaut wird. Eine konstante Größe der apikalen Zelloberfläche wird durch Reabsorption von Membran mittels Endozytosevesikeln erreicht. Die ersten Einblicke in den Membranumsatz laktierender Milchdrüsenzellen der Ratte *in vivo*, die von Welsch et al. (1984a) mit Hilfe des Lektins Con A, das mit Mannose- und Glucoseeinheiten eine Bindung eingeht, gewonnen wurden, sollen in der vorliegenden Untersuchung *in vivo* und *in vitro* mit einem Lektin, das andere Zuckerspezifitäten aufweist, erweitert werden, um u.U. die Lektinbindungsstellen zu erfassen, die besonders rasch und intensiv mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. Damit und mit eventuell in späteren Versuchen weiteren zu testenden Lektinen soll den grundlegenden Überlegungen von Patton et al. (1984) mit konkreten Experimenten weiter nachgegangen werden, ob sich ein bestimmtes noch zu ermittelndes Lektin besonders gut als Carrier eignen könnte, um Substanzen in Zellen einzuschleusen, die dort eine vorteilhafte Wirkung entfalten könnten - gedacht war hierbei an Enzyme bei angeborenen genetischen Defekten oder Gene. Die *in vitro*-Versuche sollen grundsätzlich klären, ob die Zellen auch isoliert oder in kleinen Verbänden ähnliches Lektinbindungs- und Aufnahmeverhalten zeigen wie *in vivo*. Die vorliegende Untersuchung soll weiterhin zeigen, wie weit die aufwen-

digen elektronenmikroskopischen Aufnahme- und Bindungsstudien mit ferritinmarkierten Lektinen durch fluoreszenzmikroskopische Technik ersetzt werden können.

Eine Analyse der lektinhisto- und cytochemisch erfaßbaren Membranzucker ist aus mehreren Gründen von Interesse und es liegen auch schon einige Untersuchungen zu dieser Fragestellung vor. Zu einzelnen Zuckern der Milchfettkugeln (mit Plasmamembran) oder Milchfettkugelmembran gibt es Angaben von Patton und Keenan (1975), sowie von Sasaki und Keenan (1979). Sasaki und Keenan (1979) fanden Hinweise dafür, daß bei der Ratte die Milchfettkugelmembran nicht den gleichen Zuckerbestand hat wie die apikale Plasmamembran der intakten Zelle. Schließlich beobachteten Louis et al. (1983) bei allen 69 von ihnen untersuchten malignen Tumoren der menschlichen Brust eine intensivere Bindung von Lektinen an die Plasmamembran (insbesondere von Lektinen, die spezifisch sind für Mannose und Glucose) als bei normalem oder hyperplastischem Gewebe. Weil - wie oben erwähnt - bei der apokrinen Sekretion der Milchfettkugeln ständig beträchtliche Membranteile der Zelle verloren gehen und Teil des Sekretes, der Milch, werden, ist eine Analyse der Zuckeranteile der Membran möglicherweise auch aus ernährungsphysiologischer und auch immunologischer Sicht von Interesse.

Da der Differenzierungsgrad einer Zelle in vitro von verschiedenen Parametern wie z.B. dem verwendeten Medium, der Zugabe von Hormonen und dem Substrat, auf dem die Zellen wachsen, sowie der Dauer der Kultur stark beeinflußt wird und damit zu rechnen ist, daß in Kultur eine gewisse Dedifferenzierung erfolgt, wurde in diese Studie auch eine ontogenetische Reihe der Ausdifferenzierung des Mammaorgans mit einbezogen, um festzustellen, ob sich die bei laktierenden Zellen ermittelten Lektinbindungsstellen auch schon auf frühen Differenzierungsphasen der Drüse nachweisen lassen.

MATERIAL UND METHODEN

1. Material

Verwendet wurden junge weibliche Wistarratten (Gewicht ca. 200 - 300 gr) aus der Versuchstierzucht Dr. Ivanovac, Kisslegg im Allgäu, die mit Altromin-Trockenfutter und Wasser ernährt waren und zu beiden ad libidum Zugang hatten. Laktierende Milchdrüsen wurden 8 - 15 Tage post partum untersucht. Für die ontogenetische Entwicklung wurden das Datum der Befruchtung durch Vaginalabstrich bestimmt und die Drüsen am 8., 11., 14. und 17. Tag der Gravidität entnommen sowie 2 Stunden post partum und 8 - 10 Tage post partum. Die Entnahme der Drüsen erfolgte jeweils unter Äthernarkose.

2. Lichtmikroskopische Lektinhistochemie

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen erfolgten sowohl an Schnitten von mit Bouin-fixiertem und in Paraplast eingebettetem Gewebe als auch an Kryostatschnitten unfixierten Gewebes, um den eventuellen Einfluß der Fixierung auf die Bindungsstellen erkennen zu können.

Für den Vergleich der mit beiden Techniken gewonnenen Ergebnisse wurde jeweils Gewebe aus der gleichen Drüse untersucht.

2.1 Lektintabelle

Für die lichtmikroskopische Darstellung von Lektinbindungsstellen wurden die in der Tabelle angegebenen Lektine verwendet (Bezugsquelle medac Hamburg).

Herkunft der Lektine aus:	Name des Lektins- (Agglutinin)	Abkürzung	Bindungsstellen (nach Goldstein und Hayes 1978)
<i>Canavalia ensiformis</i>	Concanavalin A	Con A	α -D-Man α -D-Glc
<i>Dolichos biflorus</i>	<i>Dolichos biflorus</i> - Agglutinin	DBA	α -D-GalNAC, D-Gal
<i>Griffonia</i> (= <i>Bandeiraea</i>) <i>simplicifolia</i>	<i>Griffonia simplicifolia</i> I Agglutinin	GSA-I	D-GluNAC
<i>Griffonia</i> (= <i>Bandeiraea</i>) <i>simplicifolia</i>	<i>Griffonia simplicifolia</i> I Agglutinin	GSA-I B4	α -D-Gal, β -D-Gal
<i>Helix pomatia</i> (Weinbergschnecke)	<i>Helix pomatia</i> - Agglutinin	HPA	α -D-GalNAC
<i>Limax flavus</i> (Nacktschnecke)	<i>Limax flavus</i> - Agglutinin	LFA	N-Acetyl- Neuraminsäure
<i>Limulus polyphemus</i> (Pfeilschwanzkrebs)	<i>Limulus polyphemus</i> - Agglutinin	LPA	N-Acetyl- Neuraminsäure
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> - Agglutinin	PHA-L	D-GalNAC
<i>Arachis hypogaea</i>	Erdnuß-Agglutinin	PNA	D-Gal- β -(1-3)- GalNAC
<i>Ricinus communis</i>	<i>Ricinus communis</i> I- Agglutinin	RCA-I	β -D-Gal
<i>Glycine max</i>	Soyabohnen- Agglutinin	SBA	α -D-GalNAC D-Gal
<i>Ulex europaeus</i>	<i>Ulex europaeus</i> I- Agglutinin	UEA-I	α -L-Fucose
<i>Triticum vulgaris</i>	Weizenkeim- Agglutinin	WGA	(β -(1-4)-D-GlcNAC)

2.2 Kryostattechnik

Zur Anfertigung der Kryostatschnitte wurde Drüsengewebe sofort nach Entnahme in physiologische Kochsalzlösung gebracht und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Kryostatschnitte (Dicke ca. $10\text{ }\mu\text{m}$) wurden für 1/2 Stunde in einer feuchten Kammer im Dunklen mit Fluoresceinisothiocyanat-(FITC)-markierten Lektinen (1 mg/ml) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte in PBS (phosphatgepufferter isotonischer Kochsalzlösung pH=7,4) gespült, mit einer 1%igen Lösung von Glycerin in PBS eingedeckt und sofort im Fluoreszenzmikroskop photographiert, um das Verteilungsmuster der Bindungsstellen zu dokumentieren.

2.3 Paraplasttechnik

Für die Paraplasthistologie wurde das Drüsengewebe gleich nach der Entnahme 2 Tage in Bouin fixiert, in Alkohol entwässert und über Methylbenzoat in Paraplast eingebettet. Die $7\text{ }\mu\text{m}$ dicken Schnitte wurden nach der Entparaffinierung in Xylol und Rehydrierung analog wie der Kryostatschnitte mit einem der FITC-konjugierten Lektine für 30 Minuten inkubiert, mit PBS gespült, mit einer 1%igen Glycerinlösung in PBS eingedeckt und ebenfalls unmittelbar danach im Fluoreszenzmikroskop photographiert. Die Alcian-Blau-Färbung (pH 2,5) wurde nach Mowry (1956) durchgeführt.

2.4 Kontrollen

Für die Kontrolle der Spezifität der Lektine wurden Paraplastschnitte a) in Puffer ohne Lektine und b) in einer Lektinlösung, der vor Inkubation des Gewebes für 30 Minuten der jeweilige spezifische Zucker (siehe Tabelle) zugesetzt war, (25 mg/ml Lektin in einer 0,2 molaren Lösung des hemmenden Zuckers in PBS). Eine eindeutige Hemmreaktion konnte bei den Lektinen Con A, HPA, LPA, PHA-L, PNA, RCA I und SBA,

eine nur schwache Hemmung bei WGA und UEA I beobachtet werden, wogegen der Hemmungsversuch bei den Lektinen DBA, GSA I und GSA I-B4 unwirksam war.

2.5 Plastik-Lichtmikroskopie und Elektronen-Mikroskopie an Ultradünnschnitten

Parallel zu den lichtmikroskopischen Untersuchungen der Lektinbindungsmuster an unfixierten Gefrierschnitten und an Bouin-fixierten Paraplastschnitten wurden von denselben Ratten während der Gravidität, 2 Stunden post partum und 8 - 10 Tage post partum Drüsengewebe entnommen, mit der Rasierklinge in kleinste Stückchen (ca. 1 mm Kantenlänge) zerschnitten und in 3,5%iger Glutaraldehydlösung 2 Stunden lang fixiert, anschließend in 1% Glutaraldehyd über Nacht in Phosphatpuffer gewaschen, 1 Stunde in 2% phosphatgepuffertem OsO_4 nachfixiert, wieder in Phosphatpuffer gewaschen, in der Alkoholreihe dehydriert und über Propylenoxid in Araldit eingebettet. 1 μm dicke Semidünnschnitte wurden mit Toluidinblau gefärbt, im Lichtmikroskop untersucht und photographiert. Die an einem Ultramikrotom UM3 der Fa. Reichert hergestellten, silbergrauen Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Diese Serie von Plastikschnitten erwies sich als notwendig, um die Befunde der lektinhistochemischen Untersuchung klarer zuordnen zu können.

3. In vivo Untersuchung der Bindung und Aufnahme von WGA auf lichtmikroskopischer Ebene

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung der in vivo Bindung und Aufnahme von Lektinen in die sekretorischen Drüsenzellen wurde WGA gewählt. Unter Äthernarkose wurden 0,2 ml WGA-FITC in Tris-Puffer (pH 7,0) (1 mg/ml) mit 0,1% Trypanblau durch die Zitze in die laktierenden Drüsen 8 - 15 Tage post partum infundiert.

Nach 10, 30 und 60 Minuten Einwirkungszeit wurde die injizierte Drüse, erkennbar durch die leichte Anfärbung mit Trypanblau, in physiologische NaCl-Lösung gebracht und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die anschließend angefertigten Kryostatschnitte (ca. 10 µm Schnittdicke) wurden sofort im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Zum Vergleich wurden Drüsen mit Con A-FITC, dessen Aufnahme in die Milchdrüse der Ratte bekannt ist (Welsch et al. 1984), infundiert und nach 30 Minuten Einwirkungszeit untersucht.

4. In vivo Untersuchung der Bindung und Aufnahme von WGA auf elektronenmikroskopischer Ebene

Mit Ferritin (oder mit Gold) konjugiertes WGA wurde in laktierende Drüsen 8 - 15 Tage post partum durch die Zitze unter Äthernarkose injiziert (0,2 ml in Trispuffer pH 7,0 mit 0,1% Trypanblau) und nach 5, 10, 30 Minuten, 1, 2 und 4 Stunden entnommen. Anschließend wurde das Gewebe für die Elektronenmikroskopie fixiert und in Araldit eingebettet (Technik siehe Absatz 2.5). Die Ultradünnschnitte wurden mit Wismut kontrastiert (Ainsworth und Karnowsky 1972).

5. In vitro Untersuchungen

5.1 Untersuchungen an isolierten Einzelzellen

Milchdrüsengewebe von trächtigen (14. - 17. Tag der Gravidität) bzw. von nicht trächtigen Ratten wurde in kalter Hank's Lösung (pH 7,3 Fa. Serva) gesammelt, zerkleinert und in Collagenaselösung mit 1,2% DNase (Collagenase 150 U/ml Fa. Seromed C III - 22, DNase I Grad II Fa. Boehringer) mit Zusatz von 1% Rinderserumalbumin (A - 7906 Fa. Sigma) für 1 1/2 Stunden bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert und durch ein Netz mit 100 µm Maschenweite filtriert. Die Zellsuspension wurde bei 800 Umdr./Min. 5 Minuten lang

zentrifugiert, dreimal in serumfreiem Medium 199 (47727 Fa. Serva) gespült, um die Kollagenase zu entfernen. Das letzte Pellet wurde in Medium 199 mit 10% fetalem Kälberserum (Fa. Biochrom) resuspendiert. Dem Medium waren die Hormone Insulin 5 $\mu\text{g/ml}$ (Nr. I - 1882 Fa. Sigma) 1 $\mu\text{g/ml}$ Hydrocortison (Nr. H - 4001 Fa. Sigma) und 1 $\mu\text{g/ml}$ Prolactin (25 I. U./mg gereinigtes Rattenprolactin National Hormone und Pituitary-Programm N I ADDK) zugegeben, ebenso Penicillin 100 U/ml und Stereptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$ (Gibco Laboratories Nr. 10 N 0032).

Ausgesät wurden 2×10^5 Zellen/ cm^2 in kollagenbeschichteten Multiwellschalen oder auf mit Poly-L-Lysine (P2636 Fa. Sigma) beschichteten Glasplättchen.

Zur Herstellung der Kollagenschicht wurden ca. 1 g getrocknete und UV-sterilisierte Kollagenfasern aus Rattenschwänzen in 200 ml 0,1% Essigsäure nach der Methode von Michalopoulos und Pitot (1975) gewonnen.

1,02 ml Kollagenlösung wurde mit 0,24 ml einer Mischung aus 2 Teilen 10x konzentriertem Medium 199 und 1 Teil 0,34 N NaOH gut gemischt und davon pro cm^2 Fläche 0,1 ml gleichmäßig in Multiwellschalen verteilt, 30 Min. zur Gelbildung bei 37°C inkubiert, über Nacht in Hank's Lösung gespült, und 1 Stunde vor dem Aussäen mit Medium 199 gespült bei Zimmertemperatur. 20 Stunden nach dem Aussäen der Zellen wurden die Kollagenschichten mit einer Skalpellschneide entlang des Schalenrandes abgelöst. Das Medium wurde täglich gewechselt.

Nach 3 bis 4 Tagen wurden die Zellen mit 50 μg WGA-Ferritin bzw. 50 μg Con A-Ferritin pro 1 ml PBS bei 37°C verschiedene Zeiten (10, 20, 30 Minuten, 1 Stunde) inkubiert und die Kollagenschicht mit den Zellen anschließend für die Elektronenmikroskopie in 1% Glutaraldehyd über Nacht fixiert bei 4°C, in Phosphatpuffer gespült, mit 1% OsO_4 1/2 Stunde nachfixiert und nach

Spülung in Phosphatpuffer in der Alkoholreihe dehydriert und über Propylenoxid in Araldit eingebettet. Die Schnittrichtung wurde senkrecht zur Kollagenoberfläche gewählt.

Für lichtmikroskopische in vitro Untersuchungen wurden auf Poly-L-Lysine beschichteten Glasplättchen gewachsene Zellen mit 50 µg WGA-FITC (1, 5, 30 Minuten, 1 Stunde), bzw. 50 µg Con A-FITC (1 Std.) pro ml PBS bei 37°C inkubiert und anschließend mit natriumacithaltigen (0,001%) PBS gespült und sofort im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

5.2 Untersuchungen an isolierten Drüsenalveolen

Um auch in Kultur Drüsenzellen mit sicher noch erhaltenen epithelialem Charakter analysierten zu können, wurden auch ganze Drüsenalveolen isoliert. Drüsengewebe wurde von Ratten 8 - 14 Tage post partum in Äthernarkose entnommen und sofort in kalter Hank's Lösung zerkleinert. Die Isolation der Alveolen erfolgte nach der Methode von O'Brien et al. (1981) in Collagenaselösung (Collagenase Typ III Fa. Sigma) 400 U/ml in Hank's Medium unter Zusatz von 10 mM Hepes bei 37°C unter leichtem Schütteln (120 Schwingungen pro Minute). Nach 1 Stunde wurde die Collagenaselösung mit den isolierten Alveolen durch Strumpfgewebe aus Nylon filtriert und für 5 Minuten bei 40 g zentrifugiert. Nach zweimaligem Spülen mit Hank's-Lösung wurden die Alveolen 1/2 Stunde bei 37°C mit einer Lösung von ferritinmarkiertem WGA (50 µg/ml Hank's-Lösung) inkubiert. Nach Zentrifugation erfolgte die Fixierung und Einbettung entsprechend der bei Gewebestückchen beschriebenen Methode.

BEFUNDE

1. Lektinbindungsstellen während der ontogenetischen Entwicklung der Milchdrüse der Ratte

Vom ersten untersuchten Entwicklungsstadium an konnten für alle untersuchten Lektine Bindungsstellen im Drüsengewebe nachgewiesen werden, deren Intensität und Verteilung aber wechseln. Um langwierige Beschreibungen zu vermeiden, sollen die an der ontogenetischen Reihe erhobenen Befunde in Tabellenform zusammengefaßt und exemplarisch photographisch dokumentiert werden.

In den Tabellen werden die Seiten- und Endaussprossungen der Gänge, auch wenn es sich schon um alveoläre Knospen handelt, vor der Geburt pauschal als Knospen bezeichnet, nach der Geburt, wenn sie sich abgerundet haben und ein weites Lumen besitzen, werden sie als Alveolen bezeichnet.

Die Tabellen stellen eine Übersicht der Ergebnisse dar, die am Milchdrüsengewebe der Ratte am 8., 11., 14., 17. Tag der Gravidität, sowie 2 Stunden post partum und von 8 - 10 Tage post partum gewonnen wurden. Da die Intensität der Fluoreszenz, die die Lektinbindung anzeigt, nicht gemessen werden konnte, wurde sie subjektiv bewertet und mit folgenden Symbolen gekennzeichnet:

- negativ
- (+) schwach positiv
- + mäßig stark positiv
- ++ mittel stark positiv
- +++ kräftig positiv
- ++++ besonders stark positiv

Es werden unter a) die Reaktionsstärke auf der apikalen Seite der Zellen und unter b) die Reaktionsstärke auf der basalen Seite der Zellen angegeben. Mit GS sind die an

Gefrierschnitten mit PS, die an Paraplastschnitten erhobene Befunde gekennzeichnet. Zusätzliche Lektinbindungsstellen wurden ebenfalls berücksichtigt und in der Tabelle unter folgenden Abkürzungen aufgeführt:

BL	Basallamina
MFGM	Milchfettkugelmembran
MZ	Mastzellen
SBG	subepitheliales Bindegewebe
SBGF	Fasern im subepithelialen Bindegewebe
ZK	Zellkerne

Lektine	8. Tag der Gravidität		11. Tag der Gravidität		14. Tag der Gravidität		17. Tag der Gravidität		2 Stunden post partum		8 - 10 Tage post partum	
	GS	PS	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Knospen o. Alveolen Con A	GS		a +		+	++	+	+	++	(MFGM)	+	(MFGM)
			b ++		++	++	++	++	++		++	
	PS		a ++		(+)	+	++	++	+++		++	
			b ++		++	++	+	+	+++		+	
Gänge Con A	GS		a -		(+)	(teils -)	+	+	++		++	
			b ++	(sBG)	++	(sBG)	++	++	++	(sBG)	++	(sBG)
	PS		a ++		(+)		++	++	++		++(+)	(teils)
			b ++	(BL u. sBG)	++	(sBG)	++	++	+++	(sBG)	(+)	(sBG)
Knospen o. Alveolen DBA	GS		a (+)	diffuser	-	diffuser	(+)	diffuser	-		(+)	
			b +	Hintergrund	+	Hintergrund	+	Hintergrund	+		++	(Gefäße)
	PS		a -		-	(ZK)	-	-	-		(+)	(ZK)
			b +		++	++	++	++	+++		-	
Gänge DBA	GS		a ++		++		++	++	-		(+)	
			b ++		++	(MZ)	+++	(MZ)	++	(MZ)	++	(sBGf u. MZ)
	PS		a -		-		-	(+)	+		+	
			b ++	(BL u. sBG)	+	(sBG)	++	(sBG)	+++	(sBG)	++	(sBG fleckig)

Lektine			8. Tag der Gravidität	11. Tag der Gravidität	14. Tag der Gravidität	17. Tag der Gravidität	2 Stunden post partum	8 - 10 Tage post partum
Knospen o. Alveolen GSA-I	GS	a	-	(+)	(MFGM)	+	(MFGM)	(+)
		b	+++	(Gefäße)	(Gefäße)	+++	(Gefäße)	+++
	PS	a	-	-	(ZK)	-	(ZK)	(+)
		b	++	(Gefäße)	++	(Gefäße)	+++	(+)
Gänge GSA-I	GS	a	-	-	-	(+)	+	-
		b	+++	+++	+++	(BL)	+++	(BL)
	PS	a	-	-	-	-	+	-
		b	+++	(BL u. SBG)	++	(BL)	+++	(diffus)
Knospen o. Alveolen GSA-I B ₄	GS	a	+	(+)	(MFGM)	+	(MFGM)	+
		b	+++	(Gefäße)	+++	(Gefäße)	+++	(Gefäße)
	PS	a	-	-	(ZK)	(+)	+	-
		b	++	++	++	++	++	++
Gänge GSA-I B ₄	GS	a	-	-	-	-	-	-
		b	+++	(BL)	+++	(BL)	+++	(BL)
	PS	a	-	-	-	-	+	+
		b	++	(BL u. SBG)	++	(BL)	+++	+++

Lektine	8. Tag der Gravidität		11. Tag der Gravidität		14. Tag der Gravidität		17. Tag der Gravidität		2 Stunden post partum		8 - 10 Tage post partum	
Knospen o. Alveolen HPA	GS	a	(+)	+	+	+	(+)	++	(im Cytoplasma)	++	(auch im Cytoplasma)	++
		b	++	++(+)	++	++	++	-	-	+		+
	PS	a	(+)	(2K)	-	++(+)	++	(im Cytoplasma)	++	++	(MFGM auch Cytoplasma)	+++
		b	+	+	++	++	+	diffus	(+)	-		-
Gänge HPA	GS	a	++(+)	+	+	+	++(+)	++	(im Cytoplasma)	++		++
		b	++	++	++	++	(ME)	++	++	++	(SBG)	+
	PS	a	+	++	++(+)	++	++(+)	(fleckig)	++	++	(im Cytoplasma)	+++
		b	++	(SBG)	diffus (SBG)	++	++	(SBG)	++	++	(SBG)	-
Knospen o. Alveolen LFA	GS	a	diffuse Reaktion	-	(2K)	-	(2K)	-	-	-	(2K)	-
		b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PS	a	-	-	(2K)	-	(2K)	-	+	+	(2K)	-
		b	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-
Gänge LFA	GS	a	diffuse Reaktion	-	(2K)	-	(2K)	-	-	-	(2K)	-
		b	+	(SBG u. MZ)	+	+	(SBG)	+	+	+	(SBG)	+++
	PS	a	-	-	(2K)	-	(2K)	-	+	+	(2K)	-
		b	+++	(BL u. SBG)	++(BL, SBG u. MZ)	+++	(BL u. SBG)	+++	(BL u. SBG)	+++	(BL u. SBG)	+

Lektine		8. Tag der Gravidität	11. Tag der Gravidität	14. Tag der Gravidität	17. Tag der Gravidität	2 Stunden post partum	8 - 10 Tage post partum
Knospen o. Alveolen LPA	GS	a -	-	-	-	-	-
		b -	-	-	-	-	-
	PS	a -	-	-	+	+	-
		b ++	++	++	++	++	-
Gänge LPA	GS	a -	-	-	-	-	-
		b (+)	+	+	++	++	+++
	PS	a -	-	-	-	+	-
		b +++	+++	+++	+++	+++	+++
Knospen o. Alveolen PHA-L	GS	a (+)	(+)	+	+	(+)	+
		b ++	+	++	++	++	++
	PS	a +	(+)	+	+	+	+
		b ++	++	++	++	++	+
Gänge PHA-L	GS	a -	-	-	-	+	+
		b ++	++	++	++	++	++
	PS	a +	+	+	+	+	+
		b +++	+++	+++	+++	+++	+++

Lektine	8. Tag der Gravidität	11. Tag der Gravidität	14. Tag der Gravidität	17. Tag der Gravidität	2 Stunden post partum	8 - 10 Tage post partum
Knospen o. Alveolen PNA	a	++++	++++	++++	++(+)	+++ (MEGM)
	b	++	++	++	+(+)	+
	a	++++	++++	++++	+++	++++ (MEGM)
	b	+	++	+(+)	-	-
Gänge PNA	a	++++	+++	+++	+++	+++
	b	++++ (BL)	++++ (BL)	++++ (BL)	+++	-
	a	++	+++	+	+++	++++
	b	++ (BL)	+++ (BL)	++ (BL)	-	- (MEGM)
Knospen o. Alveolen RCA-I	a	++	++	++	+	++
	b	++	++	++	+	++
	a	++	++	++	+	++
	b	++	+	++	-	(+)
Gänge RCA-I	a	+(+)	+	++	++	++
	b	++ (BL u. sBG)	++ (BL u. sBG)	++ (BL u. sBG)	++ (BL u. sBG)	++ (sBG)
	a	+	++	+	++	+++
	b	++ (sBG)	+	++ (sBG)	-	-

Lektine	8. Tag der Gravidität		11. Tag der Gravidität		14. Tag der Gravidität		17. Tag der Gravidität		2 Stunden post partum		8 - 10 Tage post partum	
	GS	PS	GS	PS	GS	PS	GS	PS	GS	PS	GS	PS
Knospen o. Alveolen SBA	a	++			++		+	(MFGM)	++	(im Cytopl. punktförmig)	++	(MFGM)
	b	++			++		++	(Gefäße)	++	(Gefäße)	++	(Gefäße)
	a	-			-		-		++		++	
	b	++			(+)		+		++		-	
Gänge SBA	a	++			++		++		++		++	
	b	++	(BL)		++	(BL u. sBGf)	+++	(sBG)	+++	(BL u. sBGf)	++	(BL u. sBGf)
	a	-			-		(+)		++		-	(bis auf vereinzelte Stellen)
	b	++	(BL u. sBG)		++	(sBG)	++	(sBGf)	+++	(sBG)	+	
Knospen o. Alveolen UFA-I	a	-			-		-		-		-	
	b	+	(nur stellenweise)		++	(nahe Gängen)	(+)		(++)	(nahe Gängen)	++	(Gefäße)
	a	-			-	(ZK)	-		++		-	(ZK)
	b	+++			-		++	(stellenweise)	++++	(nahe Gängen)	-	
Gänge UFA-I	a	-			-		-		++		-	
	b	+++	(BL)		+++	(BL)	+++	(BL)	+++	(BL)	++	(sBGf)
	a	-			-		-		+		-	(ZK)
	b	+++	(BL u. sBG)		++	(BL u. sBGf)	++	(BL u. sBG)	+++	(sBG)	-	(MZ)

Lektine	8. Tag der Gravidität		11. Tag der Gravidität		14. Tag der Gravidität		17. Tag der Gravidität		2 Stunden post partum		8 - 10 Tage post partum	
	GS	a	GS	b	GS	b	GS	b	GS	b	GS	b
Knospen o. Alveolen WGA	GS	a ++	GS	a ++	GS	a ++	GS	a ++	GS	a ++	GS	a ++
	PS	b ++	PS	b ++	PS	b ++	PS	b ++	PS	b ++	PS	b ++
	GS	a +++	GS	a +++	GS	a +++	GS	a +++	GS	a +++	GS	a +++
	PS	b +++	PS	b +++	PS	b +++	PS	b +++	PS	b +++	PS	b +++
Gänge WGA	GS	a +(+)	GS	a +(+)	GS	a +(+)	GS	a +(+)	GS	a +(+)	GS	a +(+)
	PS	b ++	PS	b ++	PS	b ++	PS	b ++	PS	b ++	PS	b ++
	GS	a ++	GS	a ++	GS	a ++	GS	a ++	GS	a ++	GS	a ++
	PS	b +++	PS	b +++	PS	b +++	PS	b +++	PS	b +++	PS	b +++
Knospen o. Alveolen	GS	a	GS	a	GS	a	GS	a	GS	a	GS	a
	PS	b	PS	b	PS	b	PS	b	PS	b	PS	b
	GS	a	GS	a	GS	a	GS	a	GS	a	GS	a
	PS	b	PS	b	PS	b	PS	b	PS	b	PS	b
Gänge	GS	a	GS	a	GS	a	GS	a	GS	a	GS	a
	PS	b	PS	b	PS	b	PS	b	PS	b	PS	b
	GS	a	GS	a	GS	a	GS	a	GS	a	GS	a
	PS	b	PS	b	PS	b	PS	b	PS	b	PS	b

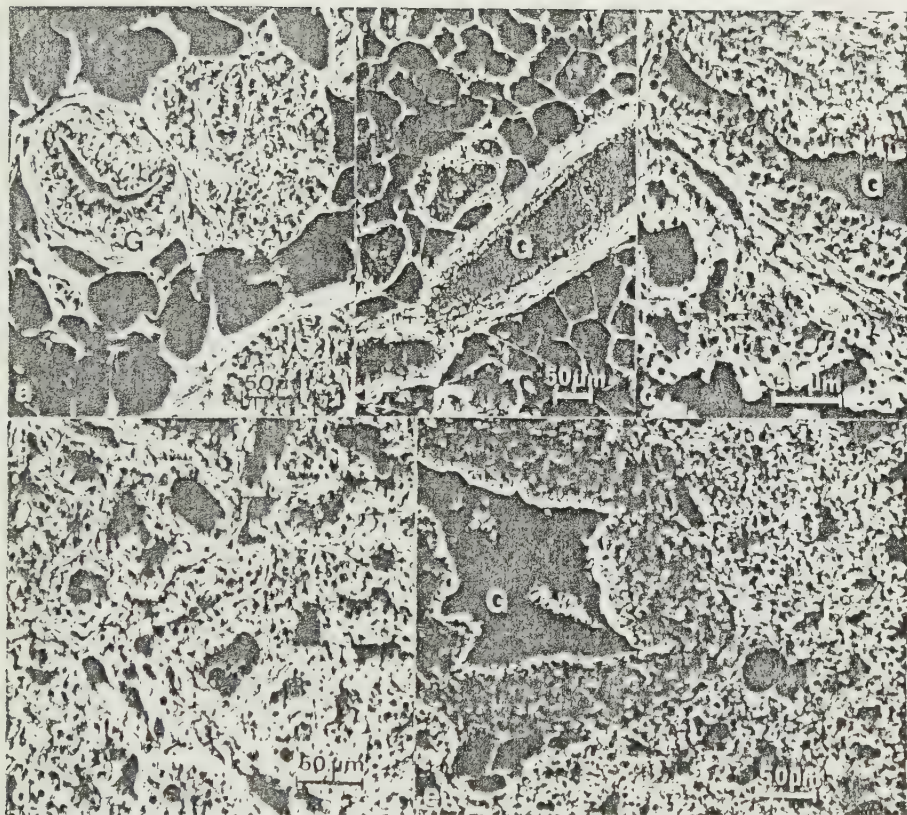


Abb. 1 a-e Con A - Bindungsstellen

a) 8. Tag der Gravidität, Paraplastschnitt. Knospen: Drüsenepithel apikal und basal ++, laterale Zellgrenzen +. Gang (G): apikale Epithelzellmembran ++ bis +, Basallamina, die zwischen die Epithelzellen ragt ++, subepitheliales Bindegewebe reagiert diffus, Faserverlauf teilweise schwach erkennbar. b) und c) 2 Stunden post partum, b) Paraplastschnitt. Alveolen: Epithelzellen apikal und basal +++, lateral ++. Gang (G) apikal ++, basal +++, subepitheliales Bindegewebe +++ mit erkennbaren Fasersträngen. c) Gefrierschnitt. Gang (G) Epithel apikal hier +, stellenweise ++, laterale Zellgrenzen +, subepitheliales Bindegewebe bis auf einzelne Faserstränge nur schwach positiv. d) und e) 8. Tag post partum, d) Gefrierschnitt. Alveolen: apikale, laterale Drüsenepithelzellmembran und Milchfettkugelmembran +, basal ++. e) Paraplastschnitt. Alveolen: apikal ++ bis +, laterale und basale Zellmembran +. Gang (G) apikal + bis ++, subepitheliales Bindegewebe (+).

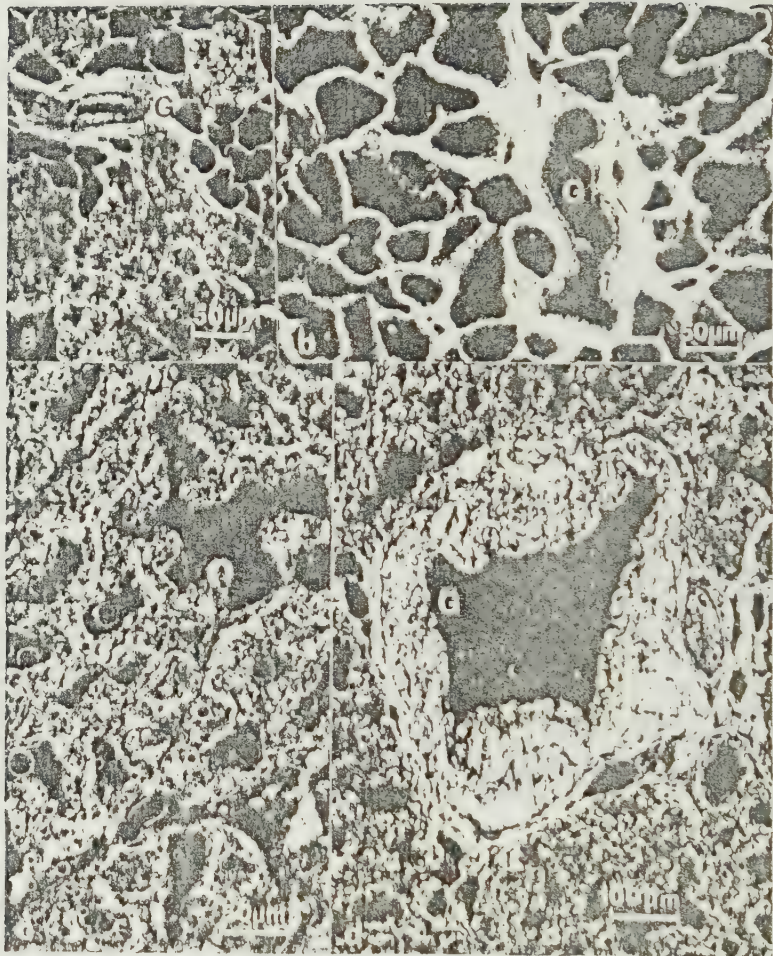


Abb. 2 a-d DBA - Bindungsstellen

a) 11. Tag der Gravidität, Paraplastschnitt. Knospen: Drüsenepithel apikal -, basal + bis ++, Gang (G): apikal, bis auf wenige Stellen -, basal subepitheliales Bindegewebe + bis ++. b) 2 Stunden post partum Paraplastschnitt. Alveolen: apikale Drüsenepithelzellen +, basal lateral (+), kräftig positive Reaktion im Bindegewebe +++. c) und d) 8. Tag post partum, c) Gefrierschnitt, Alveolen: apikale Drüsenepithelzellmembran (+), basal Gefäße (?) ++. d) Paraplastschnitt Gang (G): apikale Reaktion +, Zellkerne schwach erkennbar, subepitheliales Bindegewebe uneinheitlich, stellenweise +++.

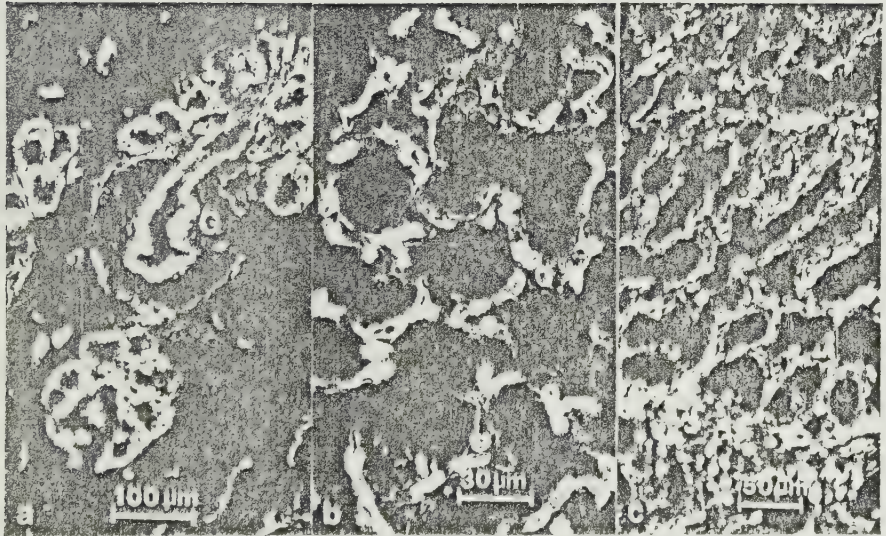


Abb. 3 a-c GSA-I - Bindungsstellen

a) 8. Tag der Gravidität, Gefrierschnitt. Knospen: apikale Drüsenepithelzellmembran -, basal, insbesondere die Blutkapillaren +++. Gang (G): apikal -, Basallamina +++, subepitheliales Bindegewebe (+). b) und c) 8. Tag post partum Gefrierschnitt, b) apikale Drüsenepithelzellmembran (+), Milchfettkugelmembran (+), Blutkapillaren ++. c) Paraplastschnitt. Apikale Drüsenepithelzellmembran negativ, Zellkerne schwach positiv, Blutkapillaren und Bindegewebszellen positiv.

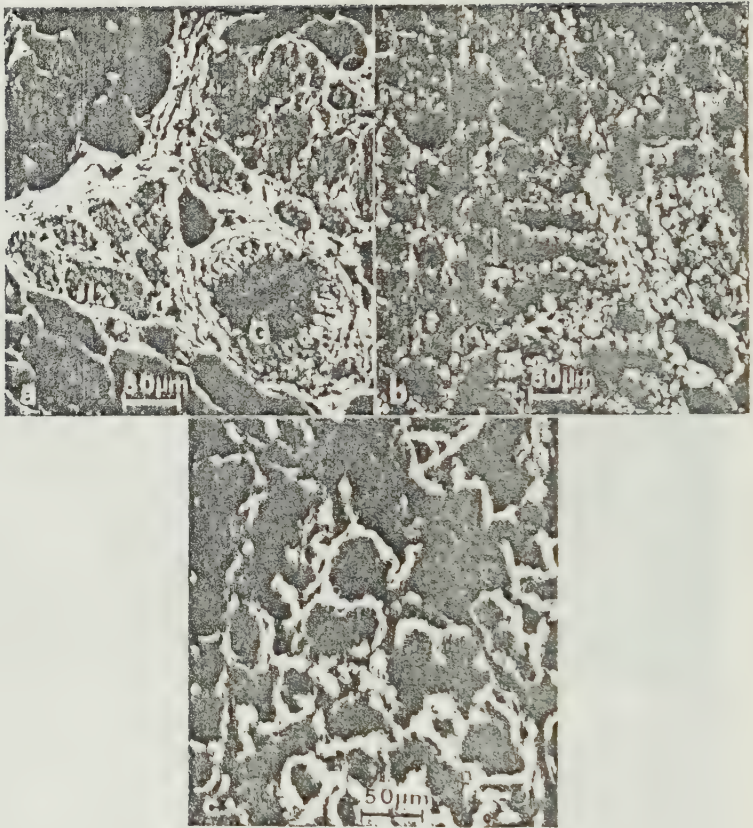


Abb. 4 a-c GSA I B4 - Bindungsstellen

a) 8. Tag der Gravidität, Paraplastschnitt. Knospen: apikale Epithelzellmembran -, Basallamina der Alveolen und interalveoläre Kapillaren ++, Gang (G): apikale Epithelzellmembran negativ, Basallamina und subepitheliales Bindegewebe ++. b) und c) 8. Tag post partum b) Paraplastschnitt, apikale Drüsenepithelzellmembran (+), basal von ++ bis -, Bindegewebszellen +++, insbesondere in Nähe eines großen Gefäßes (rechts unten). c) Gefrierschnitt, apikale Drüsenepithelzellmembran +, Milchfettkugelmembran +, kräftige Reaktion subepithelial, wobei wahrscheinlich auch die Blutkapillaren dargestellt sind.



Abb. 5 a-d HPA - Bindungsstellen

a) 17. Tag der Gravidität, Paraplastschnitt. Alveolen: apikal im Zytoplasma gelegene granuläre Fluoreszenz, basal, stellenweise +. Gang (G): tangential angeschnitten, Epithelzellmembran apikal ++ bis +++, subepitheliales Bindegewebe ++. b) 2 Stunden post partum Paraplastschnitt. Im apikalen Zytoplasma der Alveolarepithelzellen fluoreszierende punktförmige bis längliche Strukturen ++, basal nur schwach diffuse Reaktion (+). c) und d) 8. Tag post partum c) Paraplastschnitt. Apikale Alveolarepithelzellmembran +++, auch im apikalen Zytoplasma Fluoreszenz, soweit Inhalt der Alveolen erhalten ist, erkennt man auch eine deutliche Fluoreszenz der Milchfettkugelmembran ++. d) Gefrierschnitt. Alveolarepithelzellmembran teils ++ bis stellenweise +++, im Zytoplasma apikal gelegene, etwas granuläre Fluoreszenz.

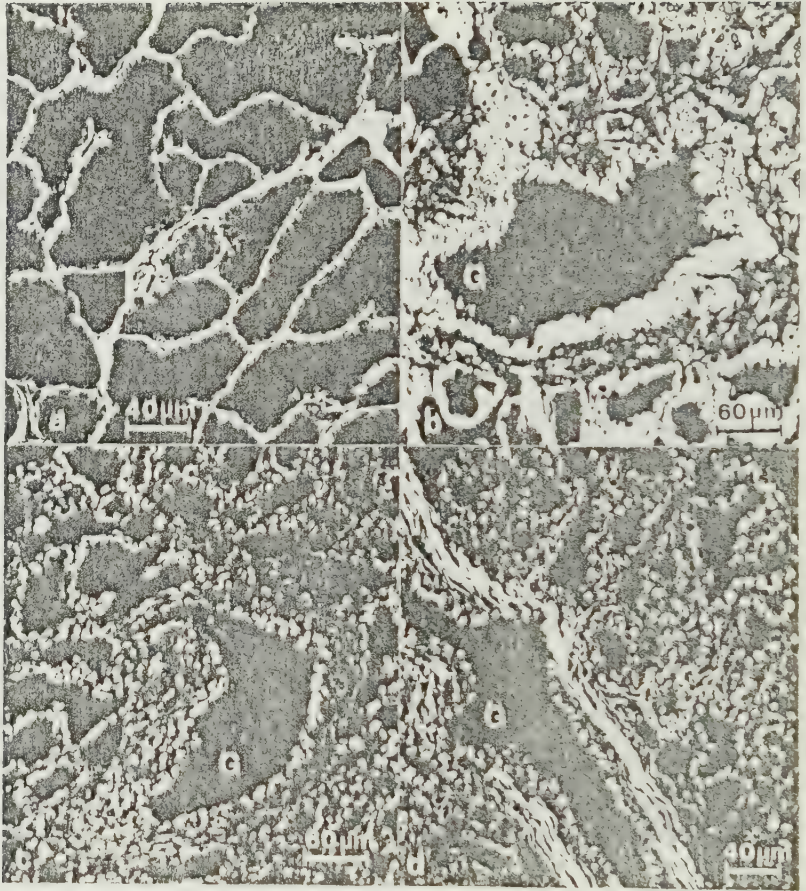


Abb. 6 a-d LFA - Bindungsstellen

a) und b) 2 Stunden post partum. a) Paraplastschnitt. Apikale Drüsenepithelzellmembran +, im Bindegewebe Reaktion ++. b) Gefrierschnitt. In den Alveolar- und Gangepithelzellen reagieren nur die Zellkerne positiv ++. Im subepithelialen Bindegewebe nur Zellkerne positiv. c) und d) 8. Tag post partum. c) Paraplastschnitt. Positiv reagieren die Zellkerne des Alveolar- und Gangepithels, während das subepitheliale Bindegewebe mehr diffus gefärbt ist. d) Gefrierschnitt. Zellkerne der Epithelzellen der Alveolen und des Ganges (G) positiv +, auffallend die sehr intensive Färbung subepithelialen Faserbündeln, bei denen es sich um Kollagen handeln könnte.

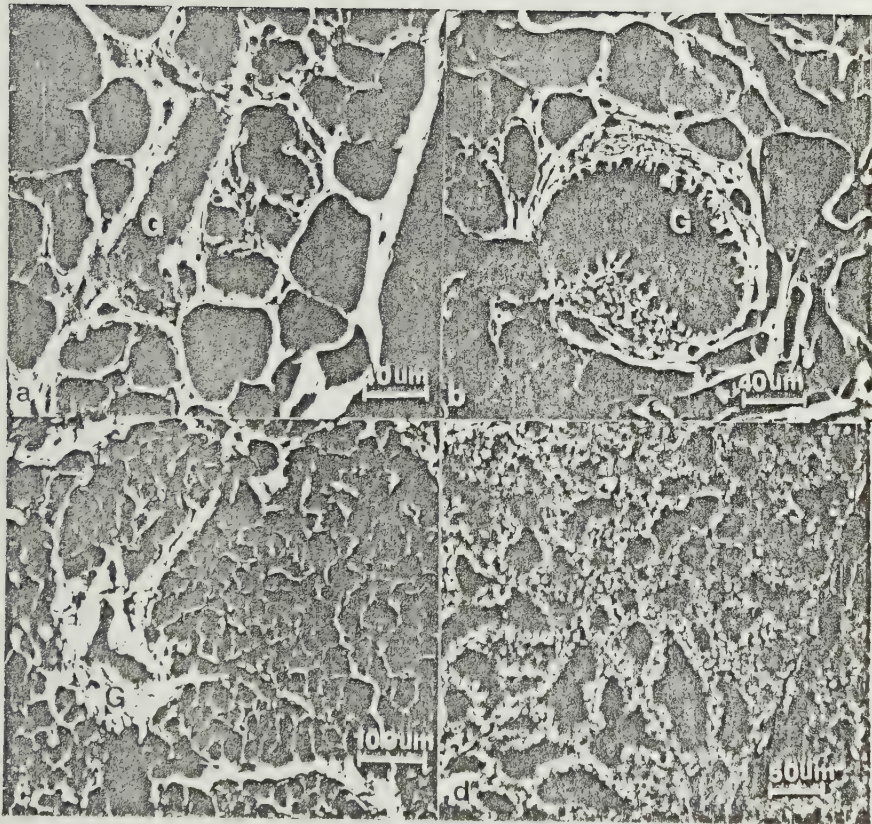


Abb. 7 a-d LPA - Bindungsstellen

a) und b) 8. Tag der Gravidität, Paraplastschnitt. Knospen: apikale Epithelzellmembran -, Reaktion an Epithelbasis ++. Gang (G): nur subepithelial positive Reaktion +++ (insbesondere in b) erkennbar) sowohl an der Basallamina, die die Basen der Epithelzellen einfaltet, als auch im subepithelialen Bindegewebe. c) 17. Tag der Gravidität, Paraplastschnitt. Knospen: nur subepithelial positive Reaktion (+ bis ++). Gang (G): apikale Epithelzellmembran -, subepitheliales Bindegewebe +++, eine schmale positive Bindegewebszone begleitet die tertiären Gänge, die nach rechts oben und rechts unten abzweigen und von denen Knospen aussprossen. d) 8. Tag post partum, Paraplastschnitt. Im Drüsenepithel reagieren nur die Zellkerne schwach positiv.

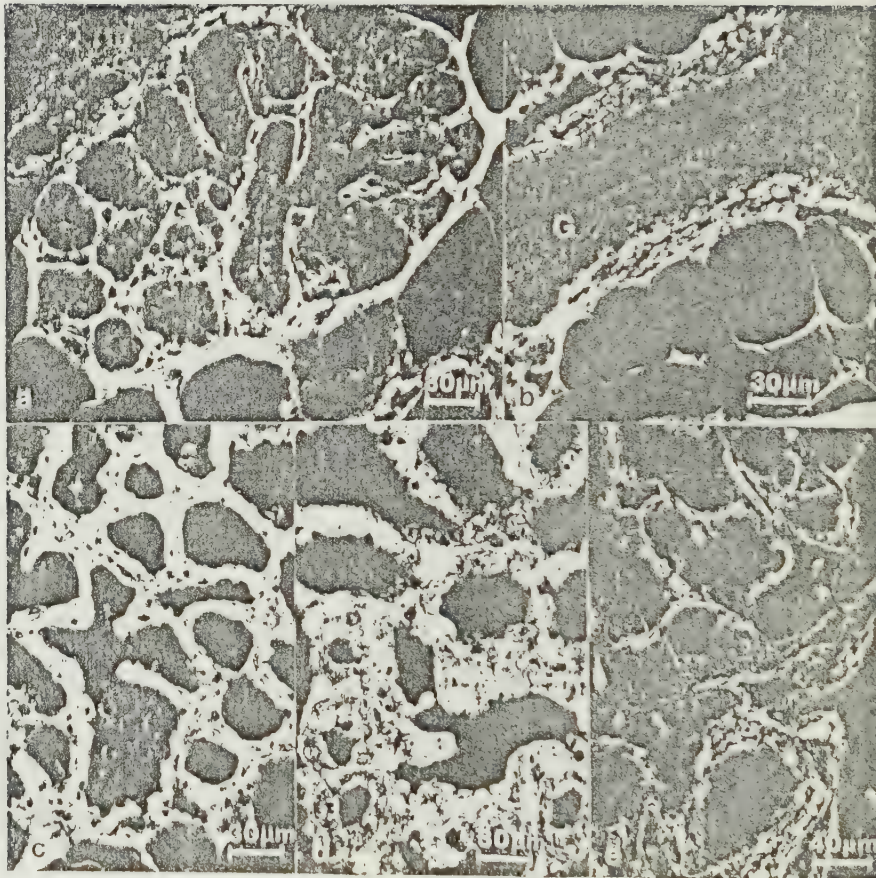


Abb. 8 a-e PHA-L - Bindungsstellen

a) und b) 3. Tag der Gravidität, Paraplastschnitt. a) Drüsenepithelzellmembran apikal und lateral schwach positiv (+), Region der Basalmembran ++. b) Im Gang (G) Epithel apikale und laterale Zellgrenzen schwach positiv (+), basal reagiert das subepitheliale Bindegewebe stärker positiv ++. c) 2 Stunden post partum, Paraplastschnitt. Apikale und laterale Zellgrenzen der Drüsenepithelzellen deutlich positiv ++, Reaktion an und unter Epithelbasis +. d) 2 Stunden post partum, Gefrierschnitt. Apikal mäßig positive Reaktion (+) der Alveolarepithelzellen, die Basalmembran darunter und die der Gefäße ++. e) 8. Tag post partum, Gefrierschnitt. Apikale Drüsenepithelzellmembran und MilCHFettkugelmembran +, subepithelial reagieren besonders deutlich die Blutkapillaren.

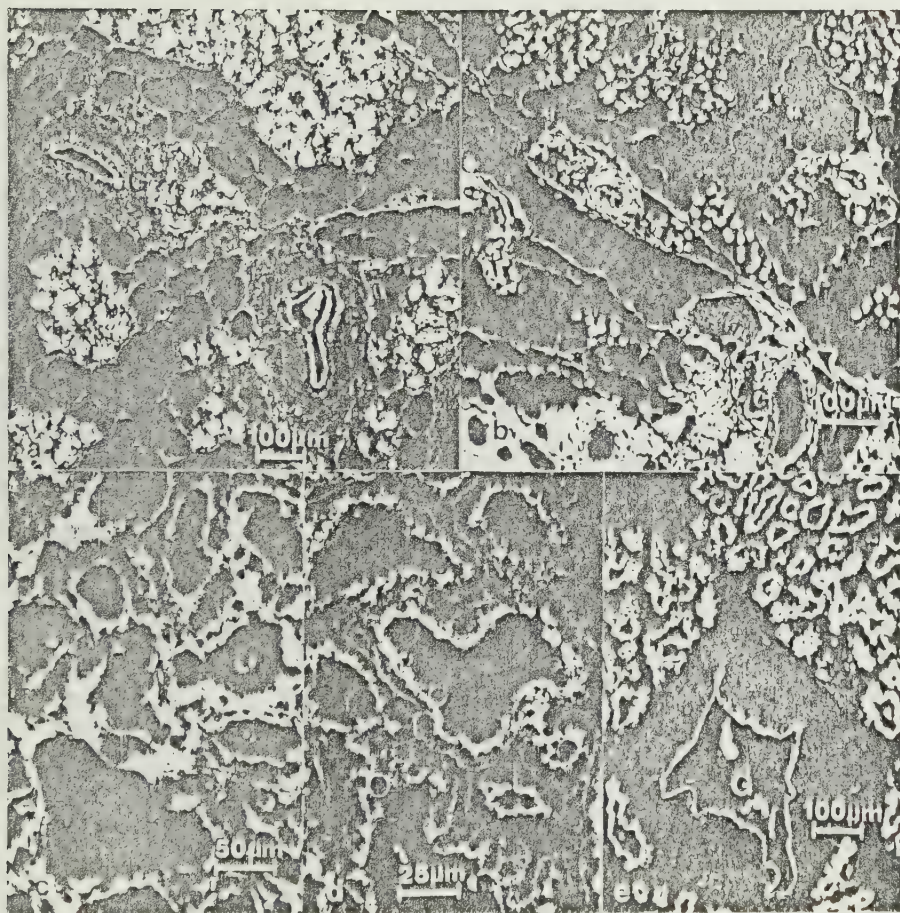


Abb. 9 a-e PNA - Bindungsstellen

a) 11. Tag der Gravidität, Paraplastschnitt. Knospen: apikale Fluoreszenz besonders kräftig, wodurch es schwierig ist, am Photo die schwächer positive Reaktion der Epithelbasis darzustellen. Gang (G): apikale Reaktion +++, Myoepithel + bis ++, Bindegewebe fast negativ. b) 17. Tag der Gravidität, Paraplastschnitt. Knospen: vergleichbar wie am 11. Tag, apikal +++, basal ++. Gang (G): apikale Reaktion -, sonst teilweise +, subepitheliales Bindegewebe ++. c) 2 Stunden post partum, Gefrierschnitt. Apikale Zellmembran der Alveolarepithelzellen +++, laterale und basale Membran + bis ++. d) und e) 8. Tag post partum. d) Gefrierschnitt. Apikale Zellmembran ++ bis +++, MilCHFettkugelmembran +, laterale Zellmembran +, basale + bis ++. e) Paraplastschnitt. Alveolen: apikal viel stärker positiv als auf dem Gefrierschnitt, basal dagegen -. Gang (G): apikale Epithelzellmembran sehr kräftig, basal Myoepithel und subepitheliales Bindegewebe negativ.

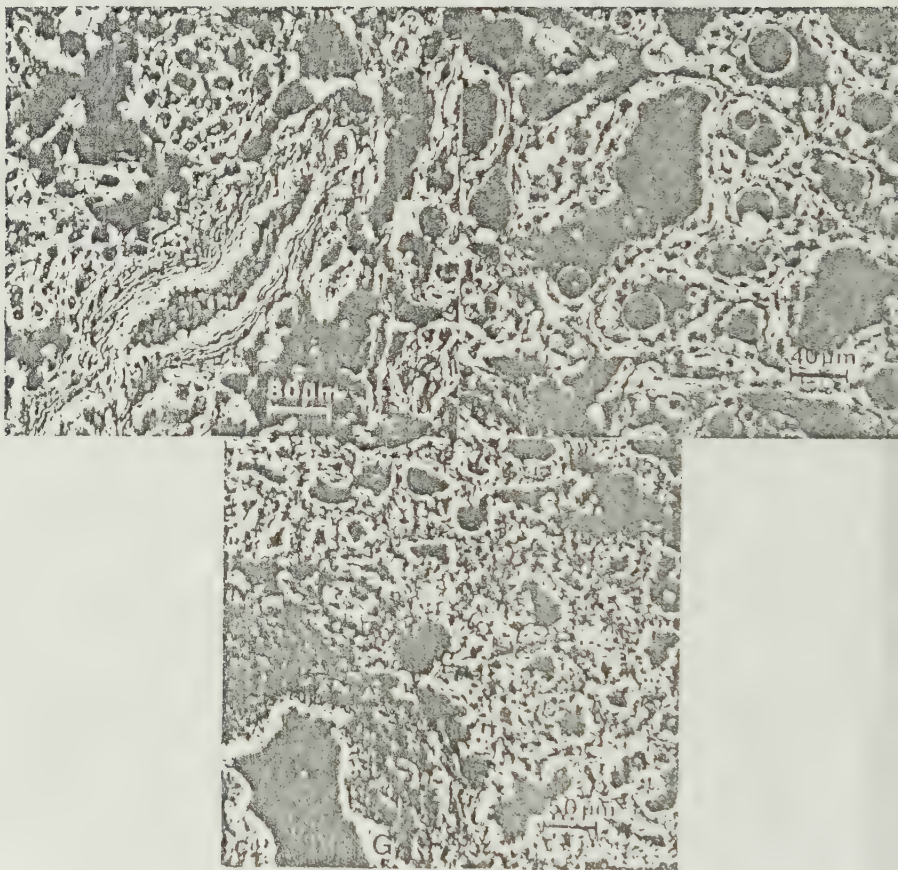


Abb. 10 a-c RCA I - Bindungsstellen

a) 11. Tag der Gravidität, Gefrierschnitt. Knospen: apikale Reaktion ++, Basalmembran ++. Gang (G): apikale Epithelzellmembran ++, Myoepithel und Fasern im subepithelialen Bindegewebe ++ bis +++. b) und c) 8. Tag post partum Gefrierschnitt, apikale und laterale Alveolarepithelzellmembran ++, ebenso Milchfettkugelmembran ++, an Epithelbasis ++. c) Paraplastschnitt. Alveolen: apikale Reaktion +++, lateral und basal (+). Gang (G): apikal Epithelzellmembran +++, an Epithelbasis -.

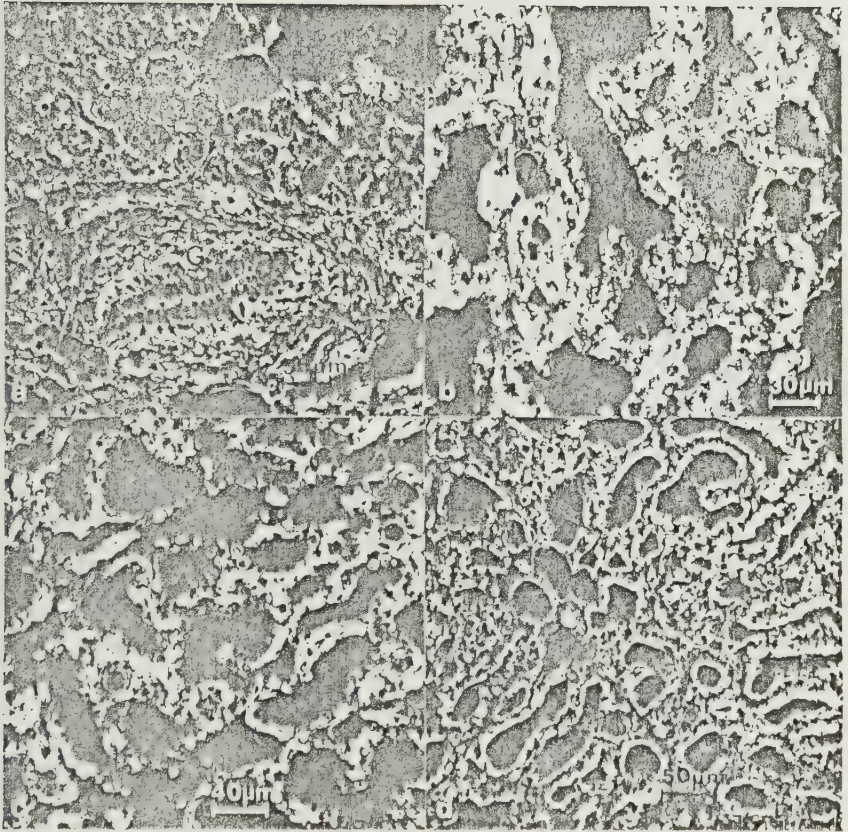


Abb. 11 a-d SBA - Bindungsstellen

a) 11. Tag der Gravidität, Gefrierschnitt. Knospen: apikale und laterale Drüsenepithelzellmembran ++, Epithelbasis ++ bis +++, Blutkapillaren +++. Gang (G): apikale und laterale Epithelzellmembran ++, Myoepithel und subepitheliale Bindegewebsfasern ++. b) 2 Stunden post partum, Gefrierschnitt, punktförmig positive Reaktion apikal und im Zytoplasma, Epithelbasis und Blutkapillaren ++. c) und d) 8. Tag post partum, Gefrierschnitt. Apikale und soweit erkennbar die laterale Alveolarepithelzellmembran, sowie die Milchfettkugelmembran positiv; Blutkapillaren stark positiv. d) Paraplaschnitt. Apikale Zellmembran des Alveolarepithels ++, Zytoplasma schwach und diffus positiv. Epithelbasis und Blutkapillaren -.

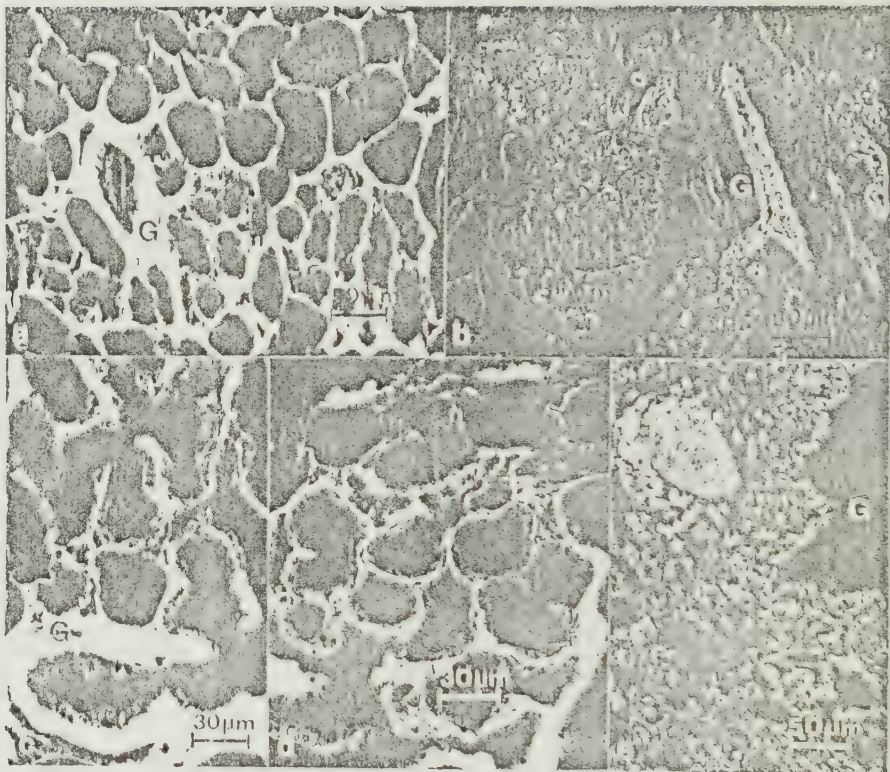


Abb. 12 a-e UEA - Bindungsstellen

a) 8. Tag der Gravidität, Paraplastschnitt. Alveolen: Drüsenepithel apikal -, basal +++. Gang (G): Gangepithel apikal -, Basallamina, Myoepithel und subepitheliales Bindegewebe +++. b) 11. Tag der Gravidität, Gefrierschnitt. Alveolen: Drüsenepithel apikal -, basal in Nähe der Gänge ++, sonst -. Gang (G): das Gangepithel reagiert positiv, insbesondere apikal; die Basallamina ist kräftig positiv. c) und d) 2 Stunden post partum, Gefrierschnitt. c) Alveolen: apikal -, Epithelbasis, besonders in Gangnähe, ++. Gang (G): Gangepithel apikale und laterale Zellmembran schwach positiv, subepitheliales Bindegewebe kräftig positiv +++. d) Gangferne Alveolen mit etwas schwächerer Reaktion an der Epithelbasis als auf Abb. 12 c. e) 8. Tag post partum, Paraplastschnitt: in den Epithelien geben nur die Zellkerne eine schwache Reaktion. In der Umgebung des den Gang begleitenden Gefäßes stark positiv reagierende Mastzellen.



Abb. 13 a-d WGA - Bindungsstellen

a) 8. Tag der Gravidität, Gefrierschnitt. Knospen: apikale Membran und Epithelbasis ++. Gang (G): apikale Epithelzellmembran + bis ++, subepitheliales Bindegewebe ++. b) 11. Tag der Gravidität, Paraplastschnitt, Alveolarepithel apikal kräftig positiv, basal etwas schwächer. c) 2 Stunden post partum, Paraplastschnitt. a) apikale Alveolarepithelzellmembran ebenso wie Milchfettkugelmembran (erkennbar an gefüllten Alveolen) ++ ebenso Epithelbasis ++, von oben nach unten zieht durch das Bild ein Bindegewebsstrang, mit erkennbar positiv gefärbten Fasern. d) 8. Tag post partum, Gefrierschnitt, die apikale Zellmembran des Alveolarepithes, sowie die Milchfettkugelmembran mäßig stark positiv, Epithelbasis ++, Blutkapillaren ++.

2. Aufnahme von WGA-FITC und Con A-FITC durch Zellen der Milchdrüse nicht gravidier Ratten, die 3 Tage in vitro auf mit Poly-L-Lysine beschichteten Glasplättchen gewachsen waren

Nach verschiedenen Inkubationszeiten erhaltene Ergebnisse:

Nach 1 Minute WGA-FITC-Inkubation (Abb. 14a)

- a) Kleinere, mehr runde Zellen (f) mit kräftiger homogener Fluoreszenz haben teilweise am Rand intensive punktförmige Fluoreszenz, die Bindungsstellen für WGA anzeigen.
- b) Ein anderer Zelltyp (*) von flacheren größeren Zellen hat ein homogen fluoreszierendes Zentrum und punktförmige intensiv fluoreszierende Strukturen, die im Cytoplasma verteilt, vor allem aber am Rand nahe der Zellmembran angehäuft sind.

Nach 5 Minuten WGA-FITC-Inkubation (Abb. 14b)

- a) Die fluoreszierenden zentralen Bereiche in den kleineren Zellen zeigen granuläre Strukturierung, die Region der Zellkerne ist als Zone reduzierter Fluoreszenz deutlich erkennbar.
- b) Die flacheren großen Zellen mit einer wesentlich schwächeren Fluoreszenz als die kleineren, mehr runden Zellen zeigen granuläre Fluoreszenz im Zytoplasma. Die Lage der Zellkerne ist als Zone ohne deutliche Fluoreszenz erkennbar.

Nach 30 Minuten WGA-FITC-Inkubation (Abb. 14c)

- a) Kleine, runde Zellen mit teils homogen, teils granulär fluoreszierendem Zentrum lassen stellenweise deutliche Bindung von WGA an die Zellmembran erkennen.
- b) Die großen flachen Zellen weisen granuläre Fluoreszenz auf, die stellenweise im Zytoplasma angerei-

chert ist. Ihre Zellmembran zeigt insbesondere an Kontaktstellen mit benachbarten Zellen deutliche Fluoreszenz.

Nach 1 Stunde WGA-FITC-Inkubation (Abb. 14d und 14e)

- a) Die kleinen, abgerundeten Zellen zeigen eine sehr intensive Fluoreszenz, so daß nur noch vereinzelt die einer Bindung von WGA an die Zellmembran entsprechende stärkere Randfluoreszenz erkennbar wird. Bei beginnender Abflachung der Zellen bildet sich neben einem intensiv fluoreszierendem Zentrum eine flachere, schwächer fluoreszierende Randzone mit feinen Fortsätzen.
- b) Die größeren, flachen Zellen zeigen eine zentrale Anhäufung fluoreszierender granulärer Strukturen, insbesondere an Kontaktstellen sind starke fluoreszierende Bereiche der Zellmembran (Zellkontakte) erkennbar (Abb. 14 e).

Bei Hemmung mit D-Glucosamin fluoreszieren die großen ausgebreiteten Zellen nicht mehr, während an den kleineren abgerundeten Zellen eine schwache Fluoreszenz noch erkennbar bleibt.

Vergleichende Inkubation mit Con A-FITC (1 Stunde)
(Abb. 14f)

- a) Auch nach Con A-Inkubation lassen sich deutlich zwei Zelltypen unterscheiden, wobei die kleineren abgerundeten Zellen sehr intensive Fluoreszenz zeigen und in ihren Randbezirken eine granuläre Unterstruktur erkennen lassen.
- b) Bei den flachen ausgebreiteten Zellen findet man häufig eine ringförmige, zentrale Anhäufung fluoreszierender granulärer Strukturen, die Zellgrenzen zeigen eine deutlich positive Reaktion, insbesondere an den Zellkontakten.

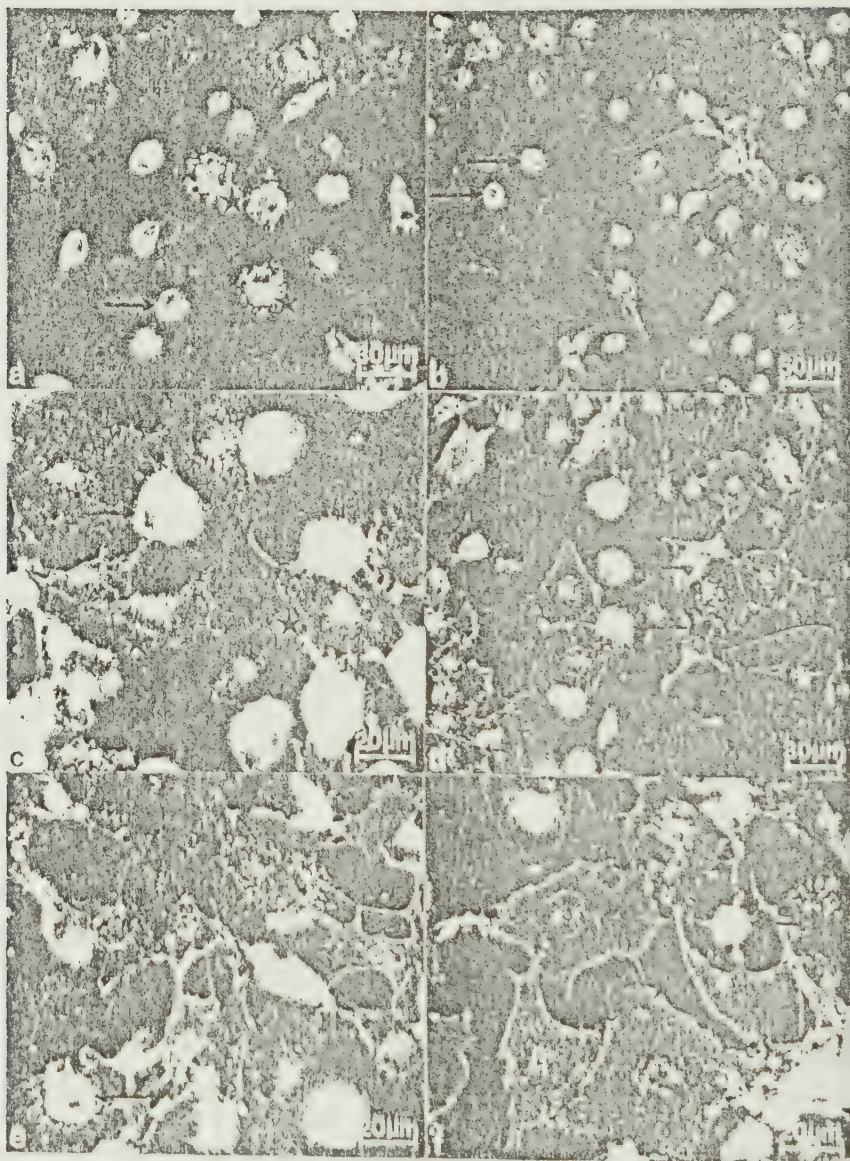


Abb. 14 a-f

In -vitro- Aufnahme von WGA-FITC (a-e) und Con A-FITC (f) a) 1 Min. Inkubation, b) 5 Min. Inkubation, c) 30 Min. Inkubation, d) und e) 1 Std. Inkubation, f) Con A-FITC 1 Std. Inkubation

3. Infusion von WGA-FITC und WGA-Ferritin in die Milchdrüse der laktierenden Ratte

a) WGA-FITC, fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Wie die im Vorhergehenden geschilderten Befunde an Schnitten grundsätzlich zeigen, wird WGA-FITC an der apikalen Zellmembran der Drüsenepithelzellen und Gangepithelzellen gebunden. Um in vivo die Bindung und den zeitlichen Ablauf der intrazellulären Inkorporation von WGA-FITC nach Infusion in die Milchdrüse zu verfolgen, wurde Drüsengewebe zu verschiedenen Zeiten (10 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde) nach der Infusion von WGA-FITC entnommen. (Zusammenfassung der Befunde siehe folgende Tabelle.)

Zeit nach der WGA-Infusion	Alveolen (Epithelzellen)	Gänge (Epithelzellen)	Bindegewebe
10 Minuten	apikal +++	apikal +++	Blutkapilaren
	intrazellulär -	intrazellulär +	-
	basal -	basal -	
30 Minuten	apikal ++ bis -	apikal ++	Blutkapillaren
	intrazellulär ++	intrazellulär ++	+
	basal - bis ++	basal - bis ++	
60 Minuten	apikal - bis ++	apikal ++	Blutkapillaren
	intrazellulär ++	intrazellulär ++	+ bis ++
	basal +++	basal +++	

10 Minuten nach Infusion in die laktierende Milchdrüse ist WGA-FITC an der apikalen Membran der Epithelzellen der Alveolen und Gänge gebunden, die MilCHFettkugelmembran fluoresziert ebenfalls. Die Epithelzellen der Gänge weisen neben einer apikalen Fluoreszenz eine Aufnahme in die Zellen auf. Bindegewebsfasern zeigen eine schwache positive Reaktion (Abb. 15a und 15b).

30 Minuten nach Infusion nimmt die apikale Fluoreszenz der Epithelien der Alveolen und Gänge ab, stellenweise ist sie verschwunden. Intrazellulär sind fluoreszierende granuläre Strukturen erkennbar.



Abb. 15 a-f. In -vivo- Aufnahme von WGA-FITC a) und b) 10 Min. nach Infusion, c) und d) 30 Min. nach Infusion, e) und f) 1 Stunde nach Infusion.

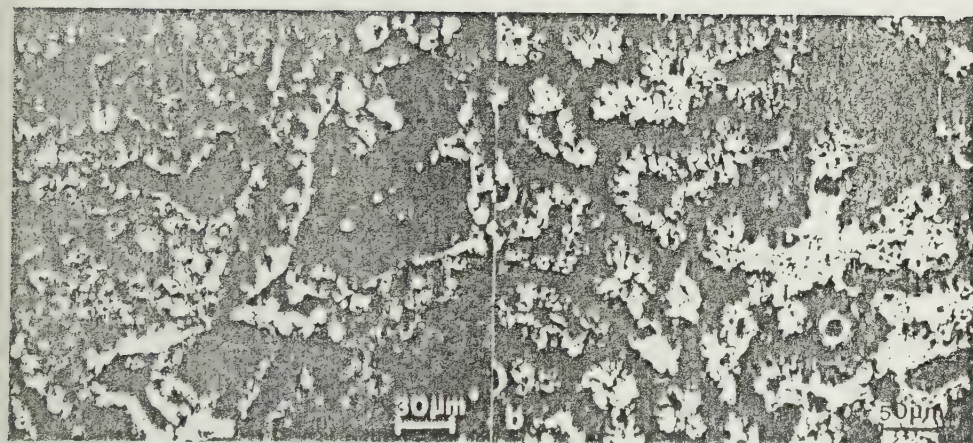


Abb. 16 a-b. In -vivo- Aufnahme von Con A-FITC 30 Min. nach Infusion.

Außerdem ist in den Zellen der Alveolen und Gänge basal teilweise eine schwache Fluoreszenz zu beobachten. Vielfach zeigen auch subepitheliale Kapillaren eine positive Reaktion (Abb. 15c und 15d),

Nach 60 Minuten ist WGA nur noch teilweise an die apikale Membran der Epithelzellen der Alveolen gebunden. Intrazellulär sind fluoreszierende punktförmige Strukturen, basal eine starke Fluoreszenz erhalten, intrazellulär sind ebenfalls punktförmige Strukturen erkennbar. Das die Gänge und Alveolen begleitende Bindegewebe fluoresziert stark, vermutlich sind es hier zum Teil Kapillaren, die besonders kräftig reagieren (Abb. 15e und 15f).

Zu Vergleichszwecken wurden auch Infusionen mit Con A-FITC durchgeführt. Con A-FITC ist 30 Minuten nach Infusion an die apikale Zellmembran gebunden. Intrazellulär sind fluoreszierende Vesikel zu beobachten, basal tritt keine Fluoreszenz auf (Abb. 16a).

b) Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Untersuchungen mit WGA-Ferritin

5 Minuten nach Infusion

WGA-Ferritin wird an die apikale Zellmembran, einschließlich der Membran der Mikrovilli gebunden und ist schon vereinzelt in glattwandigen Endocytosevesikeln nachweisbar, die nur in unmittelbarer Nähe der Zelloberfläche gefunden wurden. Coated pits oder coated vesicles mit Ferritin wurden nicht beobachtet.

10 Minuten nach Infusion

WGA-Ferritin ist wieder entlang der apikalen Zellmembran gebunden. Wie Abb. 2c zeigt, sind coated pits mit Ansammlungen von WGA-Ferritin nachweisbar. Außer in kleinen Endocytosevesikeln ist WGA-Fe



Abb. 1 a-b WGA-Ferritin-Nachweis 5 Minuten nach Infusion. a) Pfeile deuten auf Ferritinpartikel an der apikalen Zellmembran neben einer Milchfettkugel und auf Vesikel, die Ferritin enthalten; (cv) caseinhaltiges Vesikel, das offenbar mit kleineren ferritinhaltigen Vesikeln verschmilzt; b) Ferritinpartikel an der mit Mikrovilli besetzten Oberfläche und in apikal gelegenen Vesikeln (f).

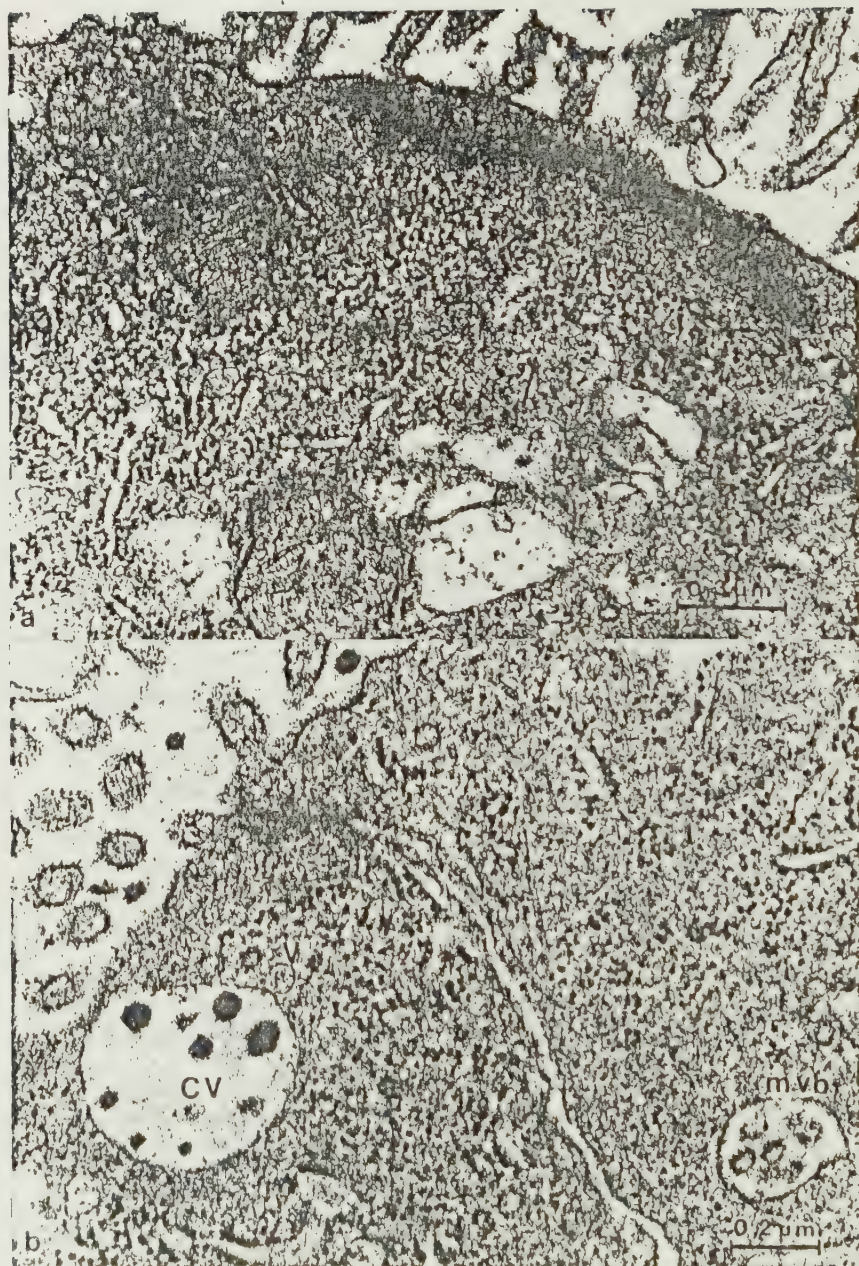


Abb. 2 a-c WGA-Ferritin-Nachweis 10 Minuten nach Infusion

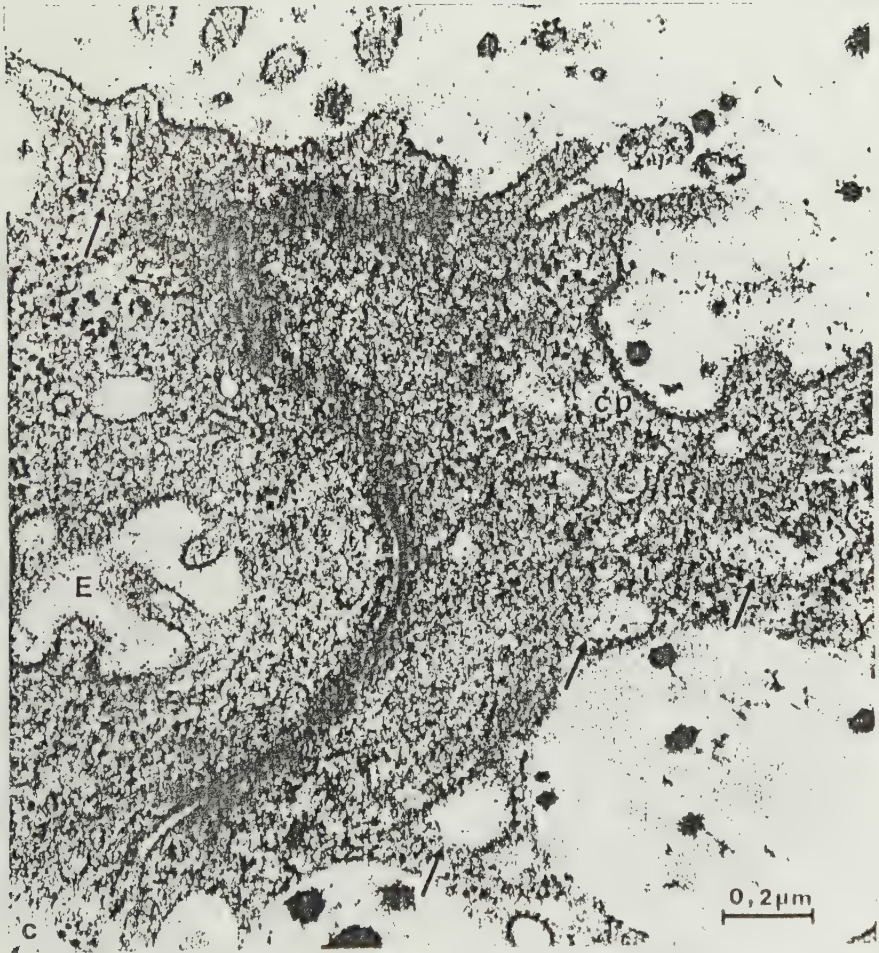


Abb. 2 a-c WGA-Ferritin-Nachweis 10 Minuten nach Infusion.
a) Zahlreiche Ferritinpartikel an der Oberfläche der apikalen Plasmamembran und ihrer Mikrovilli. Pfeil: länglicher Membranschlauch (? Praelysosom) mit Ferritin. b) Zahlreiche Ferritinpartikel an der apikalen Plasmamembran; intrazellulär Ferritinpartikel in Caseinvesikeln (CV), in glattwandigen kleinen Vesikeln (V) und in multivesikulären Körpern (mvp). c) Ferritin an der apikalen Plasmamembran und ihre Einfaltungen (E), in verschiedenen Vesikeln (f), cp coated pit.



Abb. 3 a-c WGA-Ferritin-Nachweis 1 Stunde nach Infusion.
a) Ferritinpartikel an der apikalen Plasmamembran und in glattwandigen, apikal gelegenen Vesikeln (f), ME: Myoepithelzellen.
b) Intrazellulär findet sich Ferritin in glattwandigen kleinen Vesikeln (f) in caseinhaltigen Vesikeln (cv) und in multivesiculären Körpern. c) Basal lokalisiertes ferritinhaltiges Vesikel (f), nahe der Einfaltungen der basalen Plasmamembran.

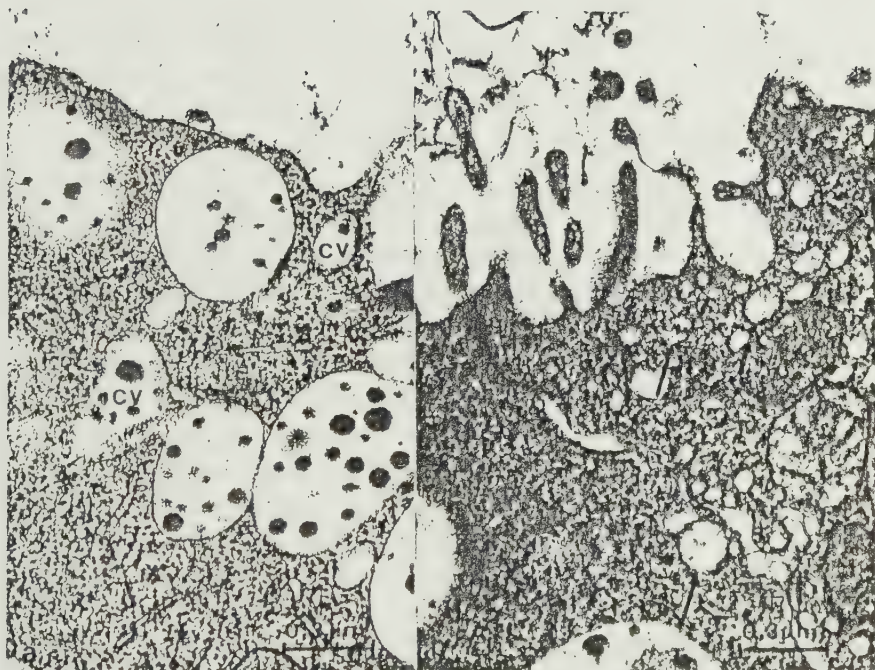


Abb. 4 a,b WGA-Ferritin-Nachweis 2 Stunden nach Infusion
a) wenige Ferritinpartikel an der apikalen Zellmembran,
cv: caseinhaltige Vesikel mit eingeschlossenen Ferritin-
partikeln. b) Pfeile deuten auf ferritinhaltige Vesikel

auch in länglichen Membranschläuchen [Praelysosomen ? (Abb. 2a, c)] sowie vereinzelt in multivesikulären Körpern und in Caseinvesikeln eingelagert. In morphologisch typischen sekundären Lysosomen mit heterogenem dichtem Inhalt lassen sich kleine Partikel erkennen, die möglicherweise auch inkorporiertem Ferritin entsprechen. Diese Partikel erscheinen jedoch durchschnittlich etwas kleiner und formvariabler als typisches Ferritin.

1 Stunde nach Infusion

Zusätzlich zu der nach 10 Minuten beobachteten Lokalisation von WGA-Ferritin-Bindungsstellen sind in den Drüsenzellen basal vereinzelt kleine WGA-Ferritin-haltige Vesikel nachweisbar. Die in Sekundärlysosomen auftretenden feinen Partikel sind hier vermehrt.

2 Stunden nach Infusion

Zwei Stunden nach Infusion von WGA-Ferritin sind die ultrastrukturellen Befunde denen nach einer Stunde gut vergleichbar; an der apikalen Membran scheint die Zahl der Bindungsstellen oft verringert zu sein. Zuweilen sind an der Innenwand der Caseinvesikeln vermehrt WGA-Ferritin-Partikel nachweisbar (Abb. 6). Immer wieder ließen sich helle Einzelzellen beobachten, deren Zytoplasma diffus mit Ferritinpartikeln durchsetzt war. Es ist zu vermuten, daß diese Form der Ablagerung ein Artefakt darstellt, zu dem es in möglicherweise geschädigten Zellen kommt (auch nach Con A-Infusion).

4 Stunden nach Infusion

Auch vier Stunden nach Infusion sind an die apikalen Zellmembran gebundene, sowie in oberflächennahen Vesikeln eingelagert, WGA-Ferritin-Partikel erkennbar. Basal treten solche Vesikel nur vereinzelt auf. Um die Aufnahme und den intrazellulären Transport von WGA noch sicherer nachweisen zu können, wurde



Abb. 5 a-b WGA-Ferritin 4 Stunden nach Infusion. a) Ferritinpartikel hier nur in einem Caseinvesikel (cv) angereichert (unkontrastierter Schnitt). b) Ferritinpartikel an dieser Stelle auch an der apikalen Plasmamembran angereichert (kontrastierter Schnitt).



Abb. 6 a-c Nachweis von WGA-Gold 1/2 Stunde nach Infusion am unkontrastierten Schnitt. Gruppen von Gold-Partikeln über der apikalen Plasmamembran. b) aggregierte Gold-Partikel im Drüsenlumen. c) vereinzelte Gold-Partikel in apikal gelegenen Caseinvesikeln.

auch Gold-konjugiertes WGA injiziert, da Goldpartikel (5-7nm) im ultrastrukturellen Bild besser erkennbar sind als Ferritin.

30 Minuten nach Infusion von WGA-Au

Nach 30 Minuten konnten Goldpartikel entweder im Drüsenlumen oder der apikalen Membran angelagert, aber höchstens vereinzelt intrazellulär nachgewiesen werden. Außerdem waren die Goldpartikel meist zu kleinen Gruppen aggregiert.

4. Elektronenmikroskopische Befunde an in vitro gehaltenen Milchdrüsenzellen gravider Ratten und an isolierten Alveolen von Ratten 8 Tage post partum, die mit WGA-Ferritin inkubiert wurden

- a) Dissoziierte Milchdrüsenzellen vom 14. bis 17. Tag der Gravidität wurden nach vier Tagen der in vitro Kultur elektronenmikroskopisch untersucht. Sie haben auf der Oberfläche der Kollagenschicht einen kontinuierlichen Zellverband und im Inneren der Schicht sogar alveolenähnliche Strukturen gebildet. Die Zellen sind bereits polarisiert und tragen an der Oberfläche Mikrovilli, die entweder mit den Kulturmedien in unmittelbarem Kontakt (Abb. 1b) stehen oder in den alveolenähnlichen Strukturen in das Lumen ragen (Abb. 1a und 1c), das zum Teil spaltförmig ist und eine feingranuläre dichte Substanz enthält. Apikal sind regelmäßig coated pits zu erkennen. Die Zellen enthalten neben Mitochondrien mit dichter Matrix relativ wenig rauhes endoplasmatisches Retikulum, auch der Golgiapparat ist nicht stark ausgeprägt. Während Lipideinschlüsse auffindbar sind, sind zu diesem Zeitpunkt Anzeichen einer Caseinproduktion morphologisch nicht zu erkennen. Zwischen den Zellen haben sich an Zellkontakten apikal tight junctions und Zonulae adhaerentes gebildet (Abb. 1d). Zentriolen werden relativ häufig beobachtet (Abb. 1e).

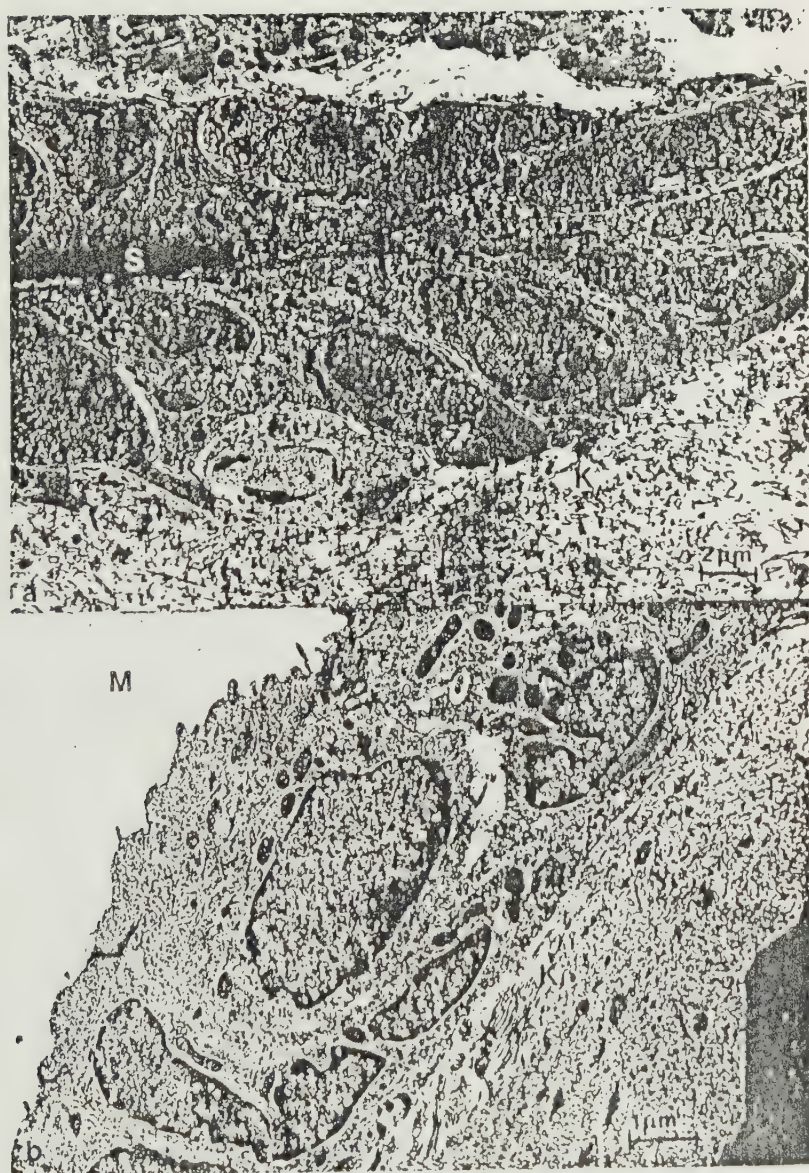


Abb. 1 a-e Milchdrüsenzellen' vom 14. - 17. Tag der Gravidität nach 4 Tagen in vitro

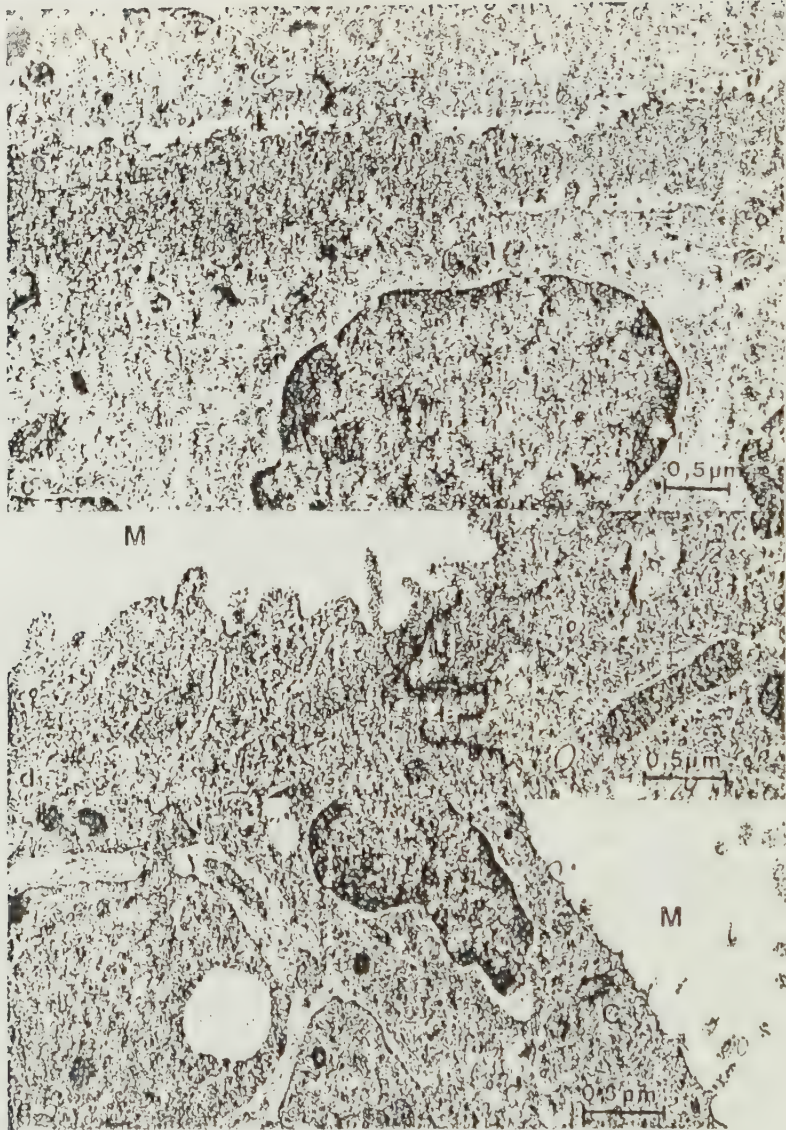


Abb. 1 a-e Milchdrüsenzellen vom 14. - 17. Tag der Gravidität nach 4 Tagen in vitro. a) in der Kollagenschicht (K) bilden sich alveolenähnliche Zellanordnungen mit einem Spalt (S), der mit dichtem Material ausgefüllt ist. b) Milchdrüsenzellen bilden eine zusammenhängende Schicht auf der Oberfläche und sind durch Zellkontakte miteinander verbunden. K: Kollagenschicht, M: Medium. c) höhere Vergrößerung einer alveolenähnlichen Zellanordnung; kleine Mikrovilli ragen in das spaltförmige Lumen. d) apikale Mikrovilli ragen in das Kulturmedium (M), Kontaktstelle mit vermutlicher tight junction (tj) und zonula adherens (za). e) Zellansammlungen an der Oberfläche zum Medium (M), Centriolen (C) sind häufig anzutreffen.



Abb. 2 a-b Alveolen die 1/2 Stunde mit WGA-Ferritin inkubiert waren (TEM). a) basale Faltungen der Zelloberfläche mit teilweise membrangebundenem Ferritin; im Zytoplasma größere und kleinere Vesikel, die Ferritin enthalten (f). b) von basal sind Ferritinpartikel ungehindert in den Intrazellularspalt (p) eingedrungen und in Vesikeln aufgenommen worden.

Die Zellen wurden bis zu einer Stunde mit Ferritin-markiertem WGA inkubiert. Während bei den auf Kollagenschicht gewachsenen Milchdrüsenzellen elektronenmikroskopisch die Aufnahme von WGA nicht nachweisbar war, wurde Fluorescein-markiertes WGA von Zellen, die auf Poly-L-Lysine beschichteten Glasplättchen gewachsen waren, schon innerhalb sehr kurzer Zeit aufgenommen (siehe Seite 34 und 35).

- b) Um isolierte Alveolen zu erhalten, wurde die Kollagenaseverdauung des laktierenden Milchdrüsengewebes abgebrochen, wenn sie als solche noch erkennbar waren und die Zellen noch nicht wie bei a) in Einzelzellsuspension vorlagen. Nach einer halben Stunde Inkubation der Alveolen mit WGA-Ferritin ist eine intrazelluläre Aufnahme der Ferritinpartikel in größere und kleinere Vesikel nachweisbar, wobei das Lektinkonjugat vorwiegend membrangebunden vorliegt. Außerdem war WGA-Ferritin ungehindert von basal in die Interzellularspalten vorgedrungen. Die intrazelluläre Aufnahme durch Endocytose erfolgt offenbar vor allem an der basalen und lateralen Zellmembran.

5. Licht- und elektronenmikroskopische Befunde an der Milchdrüse während der ontogenetischen Entwicklung in der Gravidität und während der Laktation

Um genauere Kenntnisse von der Feinstruktur der Milchdrüse zu den Zeitpunkten der Gravidität und Laktation zu erhalten, an denen die Lektinbindungsmuster erstellt wurden, ist ein Teil des Drüsengewebes der gleichen Tiere in Araldit eingebettet und der licht- und elektronenmikroskopischen Auswertung zugeführt worden. Damit ist es möglich, den Organisationsgrad der Milchdrüse sowie die Differenzierung ihrer sekretorisch aktiven Zellen zu den Versuchszeitpunkten noch klarer

darzustellen als dies bei den Paraplast- und Kryostat-schnitten, an denen Lektininkubationsversuche durchgeführt wurden, möglich ist.

8. Tag der Gravidität

Lichtmikroskopische Befunde (LM)

Ein faserarmes Bindegewebe mit zahlreichen univakuolären Fettzellen bildet zu dieser Zeit das Stroma der Milchdrüse. Verzweigte Drüsengänge mit Endknospen werden von einem Mantel aus zellreichem Bindegewebe, das gut vaskularisiert ist, umgeben. Als freie Bindegewebszellen werden häufig Mastzellen angetroffen, insbesondere in Gefäßnähe (Abb. 1a). Neben Endknospen, die noch keine sekretorische Aktivität erkennen lassen, finden sich auch schon kleine Alveolen mit deutlicher Sekretionstätigkeit. Diese Tätigkeit ist am Vorhandensein heller Vesikel und vakuolärer Einschlüsse erkennbar. Übergänge zwischen diesen beiden Ausprägungsformen sind regelmäßig zu finden. Die Kerne der Epithelzellen in Knospen mit kaum erkennbarer Sekretionstätigkeit sind meist länglich unregelmäßig konturiert, euchromatinreich und haben deutlich erkennbare große Nucleolen. In kleinen Alveolen mit erkennbarer Sekretbildung sind die Kerne ähnlich gestaltet, aber etwas dunkler. Basal liegen den Epithelzellen flache Myoepithelzellen an. Lumina sind lichtmikroskopisch in den Endknospen meist nicht mit Sicherheit nachweisbar.

Elektronenmikroskopische Befunde (TEM)

Erst das Elektronenmikroskop zeigt eindeutig, daß zumindest ein Teil der Knospen schon am 8. Tag der Gravidität Lumina gebildet hat (Abb. 2b). Die Epithelzellen haben dann apikal Mikrovilli gebildet und sind durch Zonulae occludentes und adhaerens-Kontakte miteinander verbunden. Ihr Zytoplasma enthält Mitochondrien und ist reich an freien Ribosomen, auch Glykogen und Lipid-

tropfen lassen sich regelmäßig nachweisen. Rauhes endoplasmatisches Retikulum (RER) und der Golgiapparat sind dagegen noch wenig ausgeprägt. Apikal können ribosomenreiche Protrusionen ausgebildet sein. Bei weiter ausdifferenzierten Knospen sind im Zytoplasma zahlreiche helle Lipideinschlüsse auffällig, im Drüsenlumen eine Anhäufung von granulärem Material (Abb. 2b), das sich zwei verschiedenen dichten Erscheinungsformen zuordnen läßt, a) polymorphen, dichten Aggregaten von Einzelpartikeln - vermutlich Caseinmizellen -, b) Einzelpartikeln mittlerer Elektronendichte. Im Cytoplasma sind membranbegrenzte Granula mit vergleichbarem Inhalt eingelagert (Abb. 2d), die im folgenden als Caseinvesikel bezeichnet werden. Entsprechend den zu diesem Zeitpunkt intensiven Wachstumsvorgängen sind Zellteilungen häufig (Abb. 2d). Die Gangepithelien sind unauffällig, ihre Kerne sind stark zerklüftet. Zellorganellen treten an Menge zurück, die apikale Zellmembran trägt kaum Mikrovilli, eindeutige Hinweise auf sekretorische Tätigkeit fehlen.

11. Tag der Gravidität

Lichtmikroskopische Befunde (LM)

Lichtmikroskopisch sind in den angeschnittenen Knospen häufiger Lumina erkennbar als am 8. Tag. Neben vielen Knospen mit sekretorisch deutlich aktiven Epithelzellen gibt es immer noch Knospen, bei denen am Semidünnschnitt keine Lipideinschlüsse nachweisbar sind. Im Stroma finden sich noch viele univakuoläre Fettzellen. Mastzellen liegen häufig im gut vaskularisierten zellreichen Bindegewebe nahe den Knospen.

Elektronenmikroskopische Befunde (TEM)

Die Differenzierung der sekretorischen Epithelzellen ist fortgeschritten, die Größe der Golgiapparate hat zugenommen, rauhes endoplasmatisches Retikulum ist jetzt vermehrt zu finden. Zahlreich sind verschieden

große membrangebundene Caseinvesikel mit enggelagerten Caseinmizellen. Casein findet man auch in den Lumina alveolärer Knospen. Die Polarität der sekretorischen Epithelzellen ist noch nicht ganz vollständig, so daß zahlreiche Lipidtropfen infranukleär angereichert sein können. Die Drüsengänge sind von flacherem Epithel ausgekleidet, das keine Hinweise auf sekretorische Tätigkeit zeigt. Basal im Epithel finden sich dichtgelagerte Myoepithelzellen. Das subepitheliale Bindegewebe besteht neben den oben genannten Zellen vorwiegend aus Bündeln von Kollagenfasern.

14. Tag der Gravidität

Lichtmikroskopische Befunde (LM)

Die Endknospen bestehen zum Teil noch aus undifferenzierten Zellhaufen und enthalten viele Teilungsfiguren. Andere Knospen besitzen schon ein Lumen, das einen dichten oder helleren Inhalt haben kann. Sekretorische Zellen sind durch eine Anreicherung von kleinen Fettropfen charakterisiert. In der Umgebung der Knospen sind große Fettzellen ($\emptyset$ bis zu 70 μ m und größer).

Elektronenmikroskopische Befunde (TEM)

Ein Teil der Lumina der Knospen ist wie am 11. Tag mit sehr dichten polymorphen Caseinmizellen, größere Knospen oft nur mit weniger dichten Einzelpartikeln gefüllt. Im Zytoplasma der Epithelzellen gibt es wieder kleinere und größere Caseinvesikel. Lipideinschlüsse sind überall in der Zelle verteilt, auch basal zu finden, fehlen aber nach wie vor im Drüsenlumen. Apikal treten einzelne Mikrovilli und coated pits auf, die basale Plasmamembran ist relativ glatt, bildet aber lokal einzelne schmale Fortsätze und Einfaltungen aus. Die lateralen Zellmembranen weisen apikale Kontaktzonen auf.

Die Wandung der Gänge ist zweischichtig, apikal liegen die Epithelzellen, basal findet sich eine ebenso dicke

zusammenhängende Lage von Myoepithelzellen. Das subepitheliale Bindegewebe der Gänge ist faserreicher als das der Knospen. In diesem Bindegewebe wurden neben Fibroblasten Plasmazellen und Mastzellen beobachtet.

17. Tag der Gravidität

Lichtmikroskopische Befunde (LM)

Gänge mit einem breiten faserreichen subepithelialen Bindegewebe und mit begleitenden Blutgefäßen liegen neben Ausschnitten von kleinen Knospen, bei denen jetzt oft das Lumen deutlich erkennbar ist und die daher schon als alveoläre Strukturen bezeichnet werden können. Zahlreiche Lipideinschlüsse, die nicht durch die Fixierung herausgelöst wurden, färben sich im Semidünnschnitt mit Toulidinblau dunkel an.

Elektronenmikroskopische Befunde (TEM)

Besonders auffällig sind zahlreiche Lipidvakuolen unterschiedlicher Größe, die über das gesamte Zytoplasma verteilt sind. Die apikale Zellmembran hat nun an mehreren Stellen Mikrovilli ausgebildet. Daneben sind vor allem "coated vesicles" zu finden. Kleinere "coated vesicles" finden sich in der Nachbarschaft der supranucleär gelegenen Golgiapparate. Häufig findet man Caseinvesikel, in denen ein dichter strukturierter Kern eingelagert ist. Neben zahlreichen freien Ribosomen und vielen Mitochondrien sind immer noch nur wenige Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums zu sehen. Der Inhalt der Drüsenlumina ist mit einer hellen, feingranulären Substanz gefüllt.

2 Stunden post partum

Lichtmikroskopische Befunde (LM)

Die Alveolen sind oft weitlumig und haben dünne Epithelwände. Benachbarte Alveolen sind durch sehr schmale Bindegewebssepten voneinander getrennt, die nur stellenweise durch Blutgefäße verbreitert werden. Kapillaren drän-

gen vielfach gegen das Alveolarepithel vor, das an solchen Stellen besonders dünnwandig sein kann und gegen das Lumen vorgewölbt ist. Größere Lipidtropfen wölben sich teilweise ins Lumen vor. Die Gänge sind deutlich zweischichtig, Fettzellen stellenweise noch zahlreich,.

Elektronenmikroskopische Befunde (TEM)

Insgesamt fällt auf, daß das Drüsenlumen oft sehr weit und das Epithel recht flach ist. Die meisten Drüsenepithelzellen haben einen großen Zellkern mit viel Heterochromatin und großen Nucleolus. Das nicht besonders umfangreiche Zytoplasma ist auffällig organellenreich mit viel rauhem endoplasmatischen Retikulum, Mitochondrien mit dichter Matrix und einem ausgedehnten Golgiapparat, dessen Transzisternen aufgeweitet sind und der meist seitlich, zuweilen apikal und selten auch basal vom Zellkern liegen kann. MilCHFettkugeln unterschiedlicher Größe und Caseinvesikel kommen insbesondere apikal häufig vor. Die Zellorganellen sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht so klar polarisiert angeordnet, Lipideinschlüsse kommen vereinzelt noch infranucleär vor. Unterhalb der apikalen Zellkontakte ist der Interzellularraum oft deutlich erweitert. Viel seltener sind einzelne helle zytoplasmareiche Epithelzellen zu beobachten, die durch nur wenig rauhes endoplasmatisches Retikulum freie, meist zu Polysomen zusammengelagerte Ribosomen und zahlreiche große Mitochondrien mit dichter Matrix und vielen Cristae gekennzeichnet sind. Auffällig sind weiterhin einzelne dichte Lysosomen. Das Netz der Myoepithelzellen unter dem sekretorischen Drüsenepithel ist locker angeordnet.

8. bis 10. Tag post partum

Lichtmikroskopische Befunde (LM)

Die Alveolen bieten das bekannte Bild mit sekretorisch aktiven Drüsenepithelien und Drüsenlumina mit unterschiedlichem Gehalt an Fett und Casein.

Elektronenmikroskopische Befunde (TEM)

Die Drüsenepithelzellen sind jetzt auch hinsichtlich der Verteilung der Zellorganellen deutlich polar aufgebaut. In der basalen Zellhälfte lagert infra- und paranucleär auffällig viel rauhes endoplasmatisches Retikulum, supranucleär ist ein sehr ausgedehnter Golgiapparat anzutreffen, aus dem kleine und durch Konfluieren größer gewordene Caseinvesikel hervorgehen. In der apikalen Zellhälfte finden sich einzelne multivesikuläre Körper und ovoide (ca. 0,3 μ m große) Lysosomen. Letztere können sehr kleine elektronendichte Partikel ($\emptyset$ ca. 5nm) enthalten. Auch die großen Mitochondrien sind in der apikalen Zellhälfte konzentriert. Sie sind oft größeren Lipidtropfen eng angelagert. Letztere nehmen von basal nach apikal stetig an Größe zu. Vom Zytoskelet sind Mikrotubuli (oft nur apikal) und Mikrofilamente (ca. 6 bis 7 nm $\emptyset$) in Mikrovilli und in einer feinen Schicht unter der apikalen Plasmamembran nachweisbar. Apikal an der mikrovillireichen Plasmamembran gibt es zahlreiche kleine helle Vesikel. Die Zellbasis ist relativ stark zerklüftet.

Mastzellen

Unter den freien Zellen im Bindegewebe der Drüse fielen in allen Entwicklungsstadien immer wieder die Mastzellen auf, deren Verteilung sich spezifisch mit der Alcian-Blau-Färbung nachweisen läßt.

Ihre Zahl scheint während der Ausdifferenzierung und Laktation keinen auffälligen Schwankungen unterworfen zu sein (Abb. 11a-d); eine statistische Auswertung wurde jedoch nicht durchgeführt. Sie lagern bevorzugt an Grenzflächen zwischen Bindegewebe und Fettzellen oder im Bindegewebe, das Drüsenläppchen umgibt. Post partum sind sie oft um die Drüsengänge herum konzentriert.



Abb. 1 a-c, Milchdrüse am 8. Tag der Gravidität (LM): a) verzweigter Drüsengang (G) ist im zellreichen Bindegewebe eingebettet, das gut vaskularisiert ist; (f) Mastzellen in der Nähe von kleinen Gefäßen; neben einigen univakuolären Fettzellen (Bildmitte) rechts im Bild Anschnitte von Knospen. b) Drüsengang mit Mitosefigur (M). c) höhere Vergrößerung von Knospen mit vorwiegend sekretorisch aktiven Drüsenzellen, die im Zytoplasma helle Vesikel enthalten.

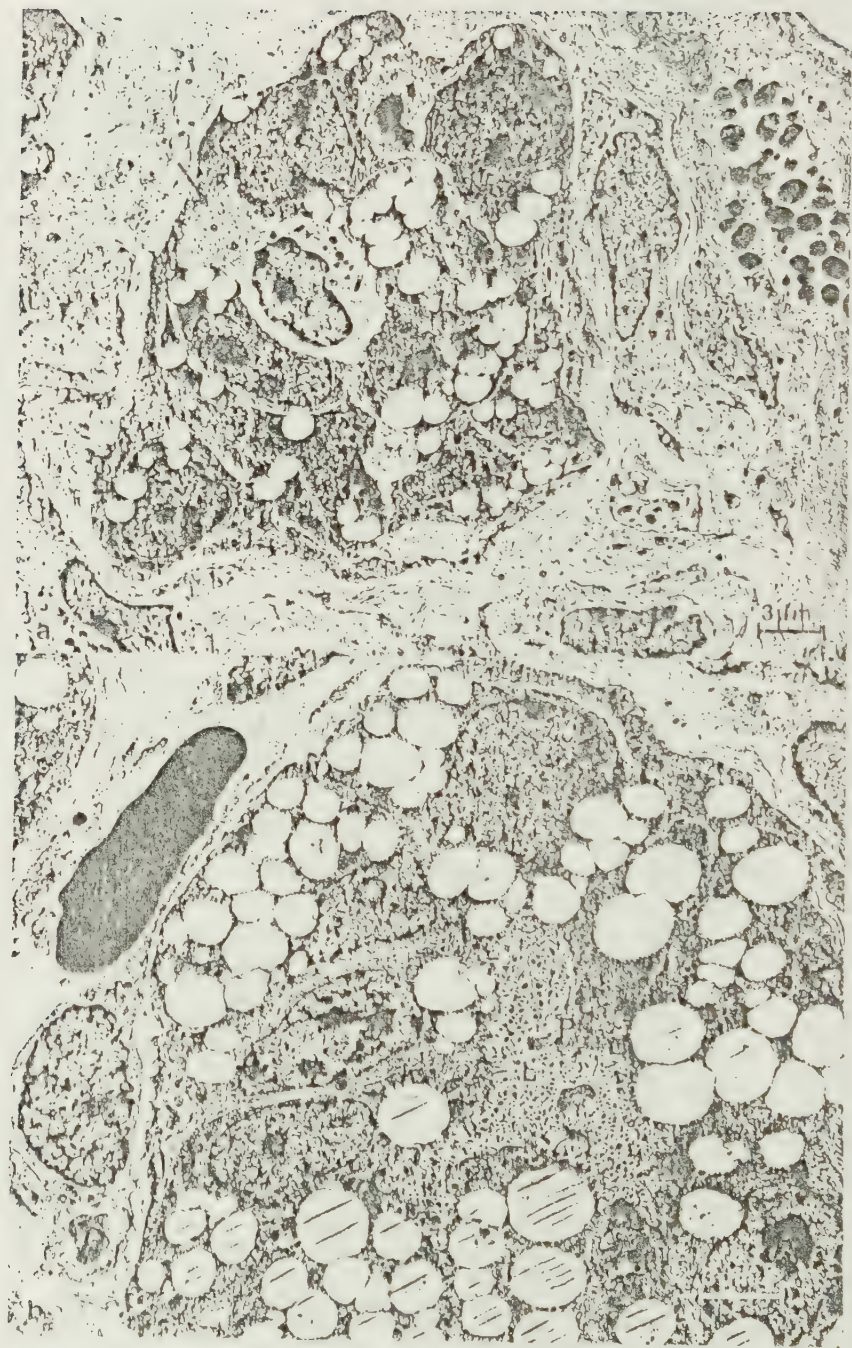


Abb. 2 a-c Milchdrüse am 8. Tag der Gravidität (TEM)

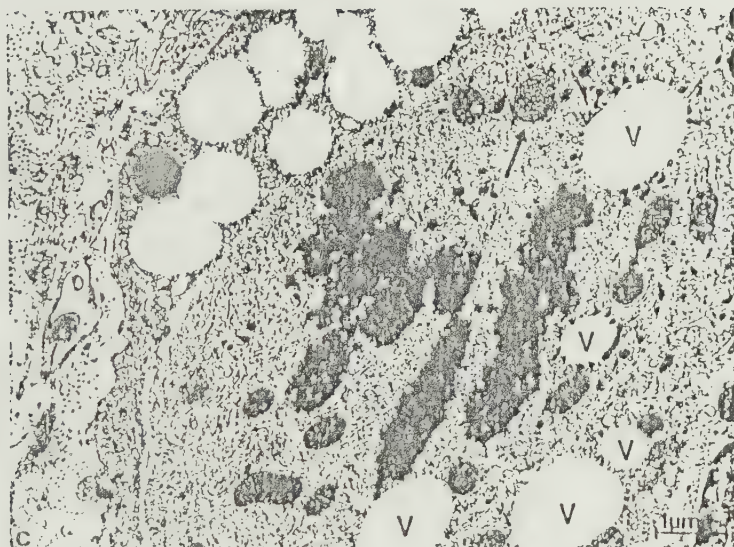


Abb. 2 a-c Milchdrüse am 8. Tag der Gravidität (TEM)
a) Knospenanschnitt ohne Lumen. (f) Zelle mit auffallend hellerem Zytoplasma ohne Anzeichen von sekretorischer Aktivität, obwohl benachbarte Zellen mit dichtem Zytoplasma Sekretvakuolen enthalten. b) Knospen mit Lumen (L); die Drüsenepithelzellen haben apikal Mikrovilli ausgebildet, (P) Protrusion, Sekretvakuolen liegen nicht nur apikal, sondern sogar basal unter dem Zellkern. Im Lumen sehr dichte Partikel, die wahrscheinlich Casein entsprechen und die in einer helleren feingranulären Matrix liegen. c) Mitosefigur einer Epithelzelle; im Zytoplasma treten neben Cisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums, freien Ribosomen und Mitochondrien mit dichter Matrix, Lipidvakuolen (V) auf; (f) membranumgebener Einschluß mit eng gelagerten Caseinpartikeln.

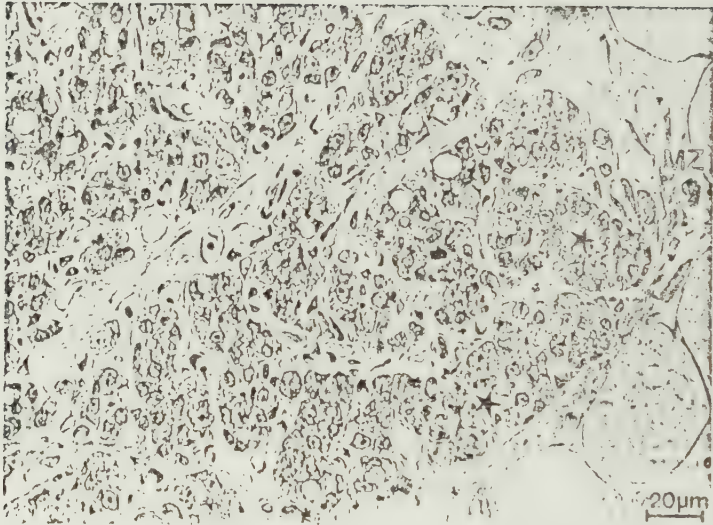


Abb. 3 Milchdrüse am 11. Tag der Gravidität (LM)
Neben Knospen mit sekretorisch sehr aktiven Drüsenzellen,
die helle Sekreteinschlüsse enthalten, Drüsenanteile die
noch keinerlei Sekret enthalten (*); das Stroma ist
stark vaskularisiert; (MZ) Mastzelle.

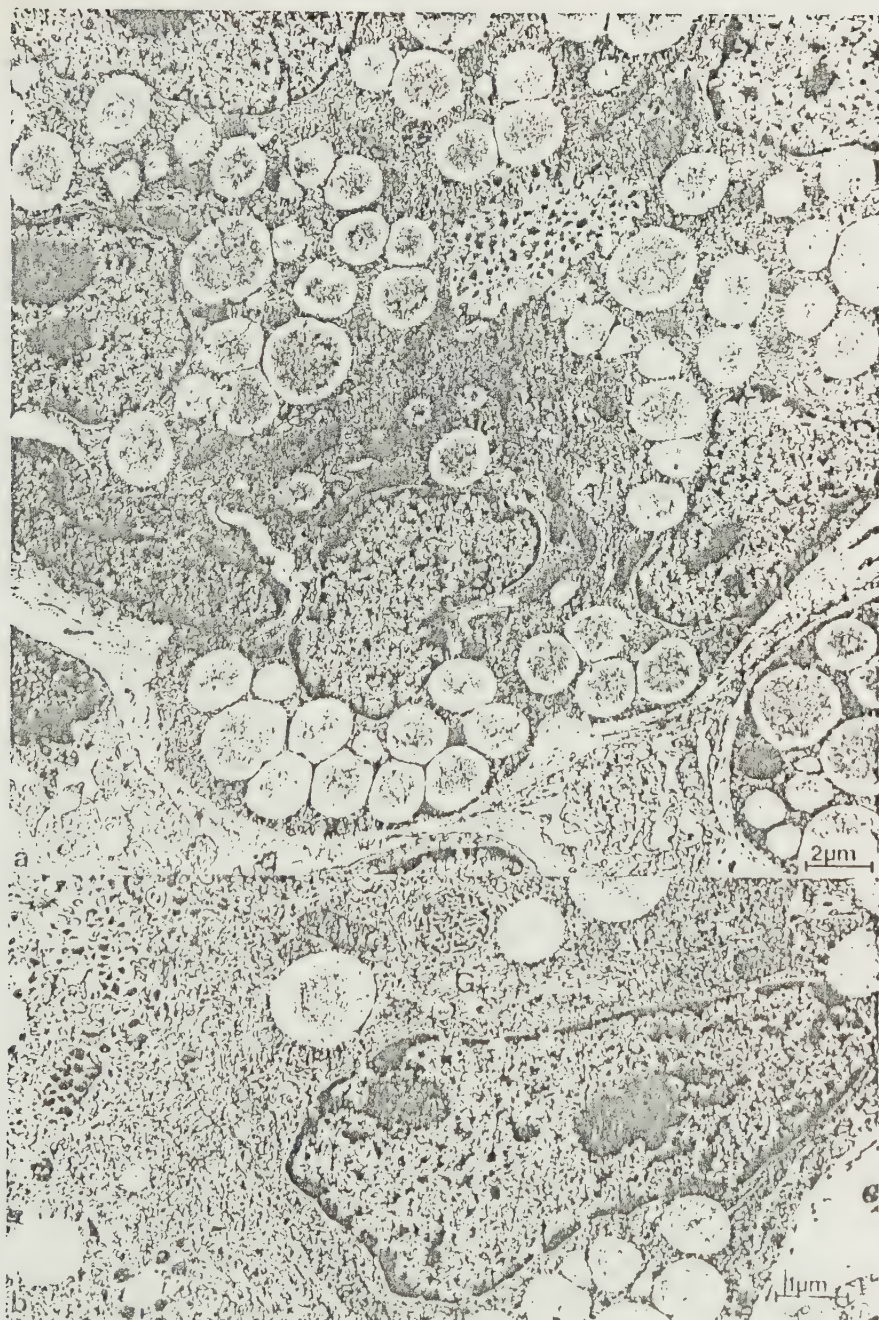


Abb. 4 a-c Milchdrüse am 11. Tag der Gravidität (TEM)

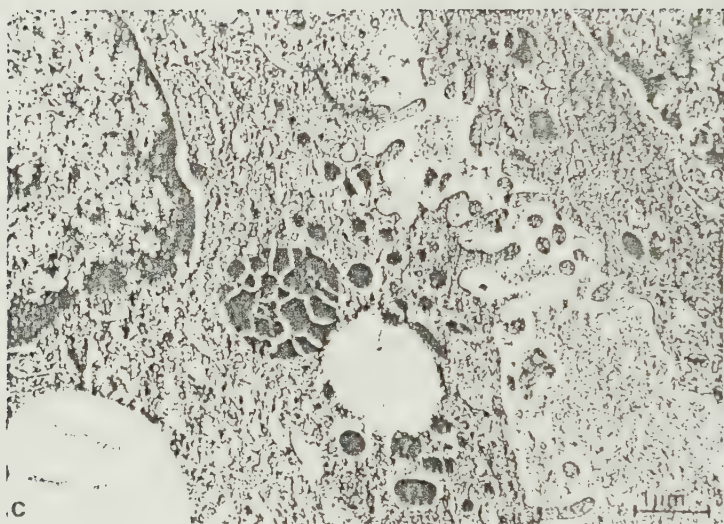


Abb. 4 a-c Milchdrüsen am 11. Tag der Gravidität (TEM).
a) Knospen mit Lumen (L); im Zytoplasma neben zahlreichen freien Ribosomen vermehrt Mitochondrien in Kernnähe und im gesamten Zytoplasma verteilte Lipideinschlüsse. b) Golgiapparat (G) mit etwas dilatierten Zisternen auf der Transseite. c) apikaler Zellbereich mit Mikrovilli und unterschiedlich großen granulären Einschlüssen, die vermutlich besonderen Formen der Caseinvesikel entsprechen.



Abb. 5 a-b Drüsengewebe am 14. Tag der Gravidität (LM). a) Gang (G) (tangential geschnitten) ist von zellreichem faserhaltigen Bindegewebe umgeben; neben Anschnitten von Knospen, große univakuläre Fettzellen (F). b) Knospen mit z. T. schon relativ großen Lumina (L); neben sekretorisch aktiven Zellen mit zahlreichen Lipidtropfen, Zellen mit hellerem Zytoplasma ohne Anzeichen einer Sekretion (I), gefäßreiches Bindegewebe zwischen den Knospen.



Abb. 6 a-e Drüsengewebe am 14. Tag der Gravidität (TEM)

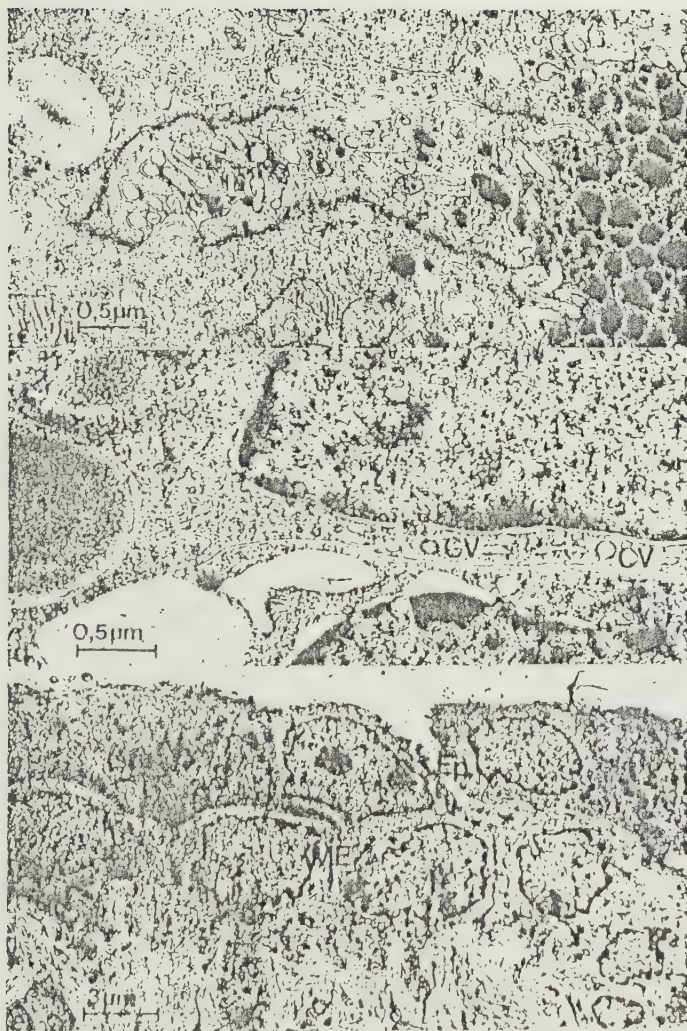


Abb. 6 a-e Drüsengewebe am 14. Tag der Gravidität (TEM). a) alveoläre Knospe, deren Lumen viele sehr dichte Caseinmizellen enthält. (f) basale bzw. laterale Faltungen der Plasmamembran; zahlreiche Lipidtropfen willkürlich im Zytoplasma verteilt; caseinhaltige kleinere Vesikel und Aggregate von Casein bevorzugt apikal. b) im Lumen und in den apikalen Zellregionen verschiedene Formen von Caseinmizellen (c). c) das buchtenreiche Drüsenlumen (L) ist zweimal angeschnitten; ausgedehnte Zellkontakte (mit tight junctions und zonulae adhaerentes). d) von der lateralen Zellmembran werden coated vesicles (cv) abgeschnürt. e) Drüsengang. Epithelzellen (Ep) und darunterliegende Myoepithelzellen (ME) bilden jeweils eine kontinuierliche Schicht.

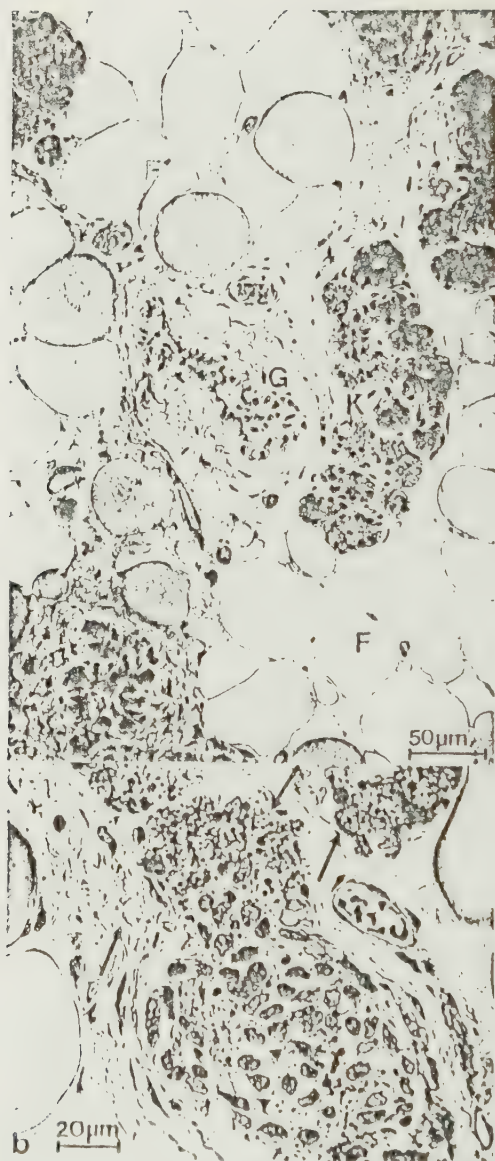


Abb. 7 a-b Drüsengewebe am 17. Tag der Gravidität (LM).
a) quergeschnittene Gänge (G) und Knospen (K), die schon ein gut erkennbares Lumen aufweisen; zwischen dem Drüsengewebe viele Fettzellen (F). b) Knospen mit teils sehr starker Einlagerung von Lipidtropfen (f); ▲ Regionen, die nur schwach sekretorisch aktiv sind.

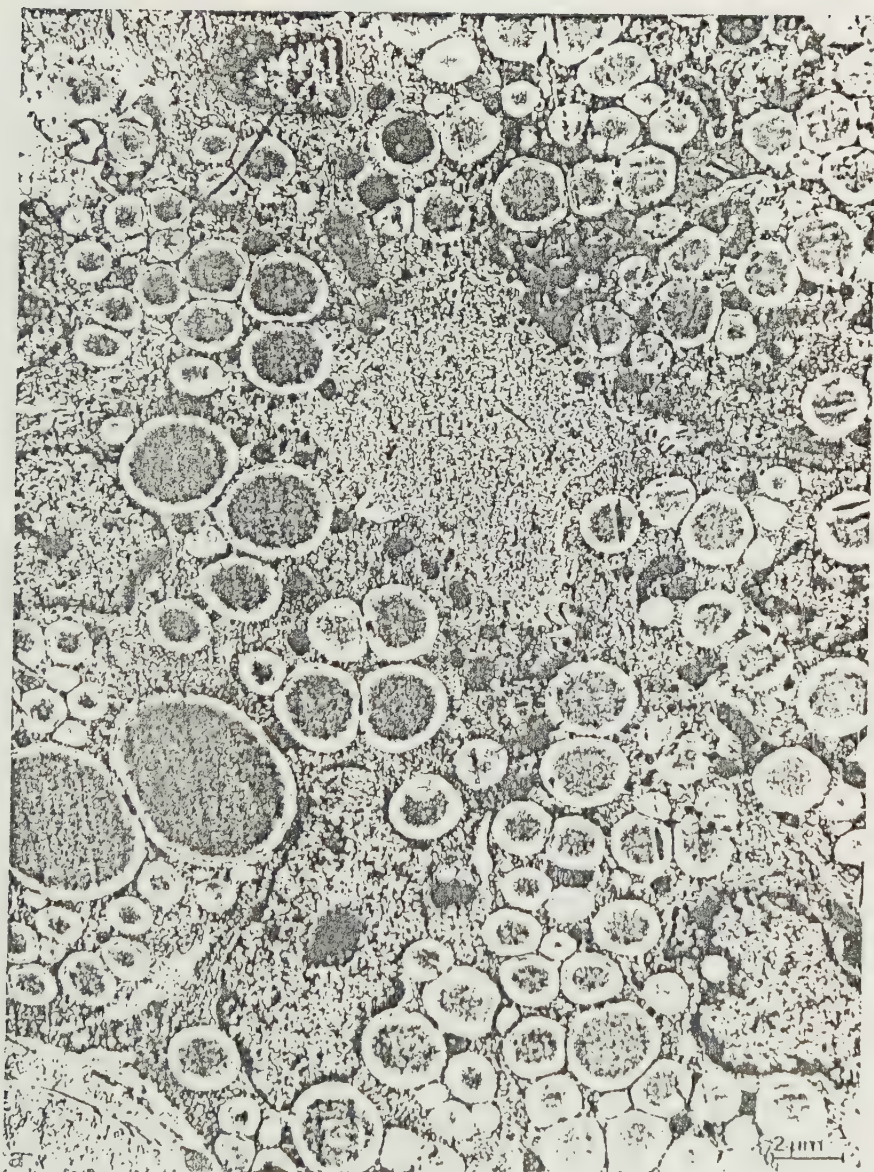


Abb. 8 a-d Drüsengewebe am 17. Tag der Cravidität (TEM). a) Im Zytoplasma der Drüsenepithelzellen sind Lipidtropfen stark angereichert, daneben relativ wenige Caseinvesikel; Lumen (L) fast frei von Casein. b) Ausschnitt aus a), Casein in verschiedener Form in Vesikeln (c) gespeichert. Beachte die zahlreichen apikalen und lateralen coated pits und coated vesicles (Pfeile). c) apikaler Zellbereich mit Mikrovilli coated pits und coated vesicles (Pfeile), tj ausgedehnte tight junction. d) großer Golgiapparat (G) mit vielen, in der Nähe gelegenen relativ kleinen coated vesicles (Pfeile) und größeren, caseinhaltigen condensing vacuoles (c).

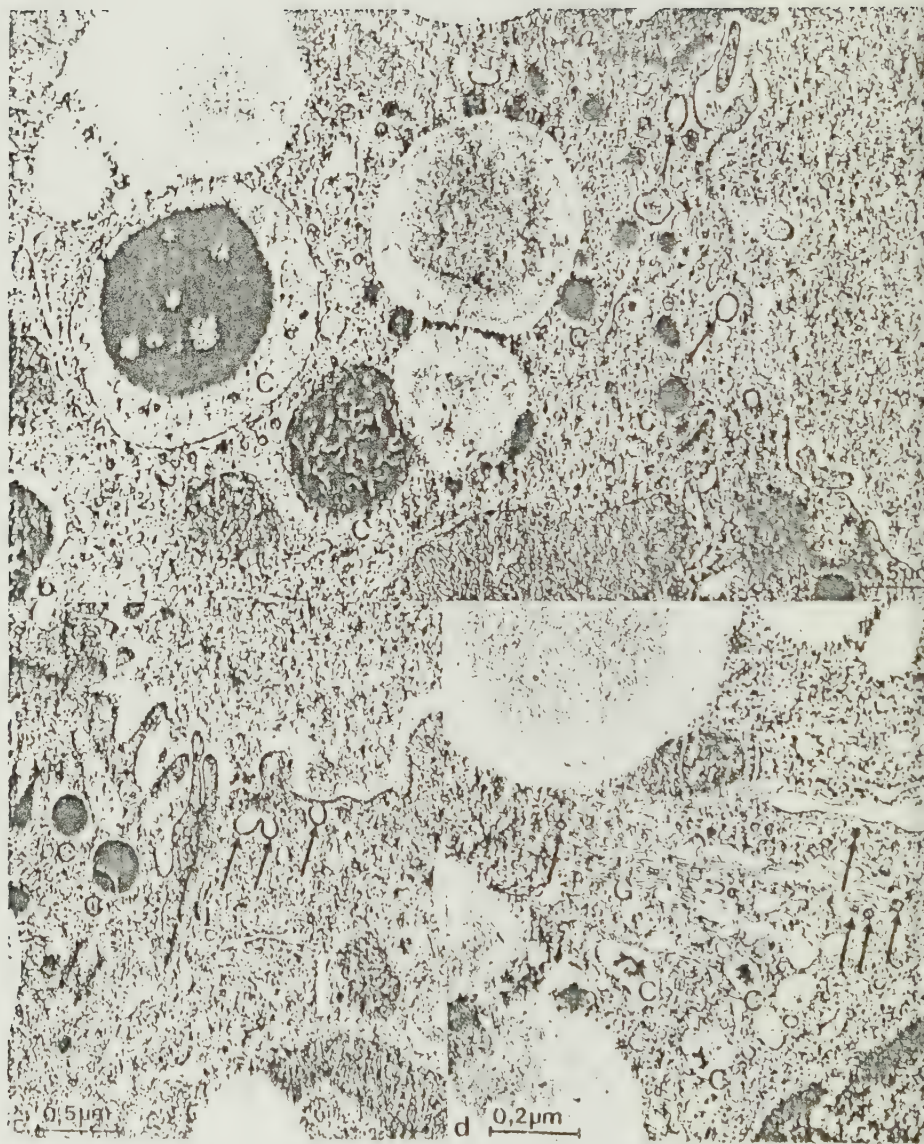


Abb. 8 a-d Drüsengewebe am 17. Tag der Gravidität (TEM)



Abb. 9 a-c Milchdrüsengewebe post partum (LM). a) und b) zwei Stunden post partum; a) aufgeweitete dünnwandige Alveolen, die Bindegewebsräume dazwischen teilweise so eng, daß Blutkapillaren (!) die Alveolenwände vorwölben, die an solchen Stellen besonders dünn sind. b) Ausschnitt aus a). c) 10 Tage post partum. (A) Alveolen mit unterschiedlicher Lumenweite, (G) Drüsengang, (F) interstitielles Fettgewebe.



Abb. 10 a-b Drüsengewebe 2 Stunden post partum (TEM). a) MilCHFettkugeln (M), Caseinvesikel (cv) sowie ein ausgedehntes Golgiefeld (G) in sekretorisch sehr aktiven Drüsenepithelzellen; (ME) Myoepithelzelle, (BL) Basallamina, (K) Blutkapillare in einer Falte der Epithelwand, (L) Drüsenlumen. b) neben sekretorisch aktiven Drüsenzellen mit sehr dicht gelagertem rauhen endoplasmatischen Retikulum, hellere sekretorisch nicht aktive, unreife Zelle mit apikalen Mikrovilli.



Nachweis von Mastzellen in Paraplastschnitten mit Alzianblau (pH 2,5)

Abb. 11 a-d a) 8. Tag der Gravidität. Insbesondere an der Grenze zwischen der Anlage von Knospen und dem reichlich vorhandenen Fettgewebe finden sich Mastzellen (Pfeile).

b) 11. Tag der Gravidität. Neben dem Drüsengang (G) Aussprossungen mit dicht gelagerten Knospen (K), Mastzellen (Pfeile) bevorzugt in Randzonen des Bindegewebes, die entweder an Drüsenknospen oder Fettzellen grenzen.

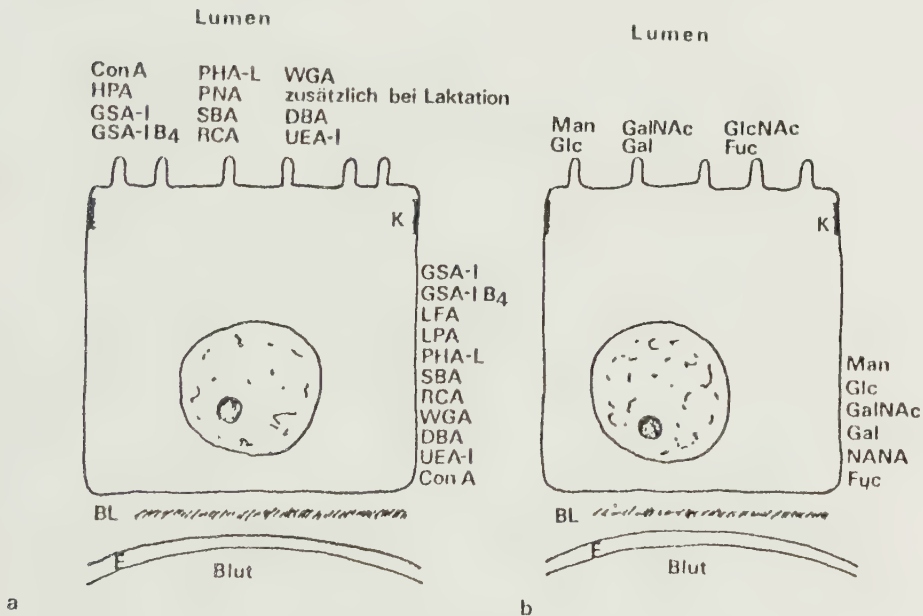
c) zwei Stunden post partum. Mastzellen (Pfeile) in Nähe eines Drüsenganges (G) oder in schmalen Bindegewebssepten, die Gruppen von Alveolen umgeben.

d) 10 Tage post partum. Mastzellen (Pfeile) im Bindegewebe, insbesondere in Nähe größerer oder kleinerer Gänge (G).

DISKUSSION

Die vorliegende Untersuchung hat zunächst gezeigt, daß die Mammaepithelzellen der Ratte auf allen untersuchten ontogenetischen Entwicklungsstadien eine beträchtliche Zahl von Bindungsstellen für verschiedene Lektine aufweisen. Da speziell die ersten Stadien vom 8. und 11. Tag der Gravidität gerade in Entstehung befindliche Drüsenknospen erfassen, darf vermutet werden, daß die große Mehrzahl der nachgewiesenen Lektinbindungsstellen die Mammarydrüsenzellen von Anfang an charakterisieren. Da bei Differenzierungsprozessen, wie sie bei Epidermiszellen der Maus und des Menschen (Nemanic et al. 1983) bei der Ausreifung von Spermien der Ratte (Malmi 1983) oder bei der Entwicklung des neuralen Ektoderms von Rattenembryonen (Currie et al. 1984) deutliche Änderungen im Lektinbindungsmuster nachgewiesen wurden, ist erstaunlich, daß es im Laufe der Gravidität nicht zu vergleichbaren Änderungen in der Milchdrüse kommt. Zwar ist offenbar die Zahl der Bindungsstellen für die Lektine Con A, GSA-IB₄, SBA und UEA kurz nach der Geburt etwas größer als gegen Ende der Gravidität oder nach 8 bis 10 Tage dauernder Laktation, aber es ist keine kontinuierliche Änderung im Lektinbindungsverhalten während der Gravidität nachweisbar. Auffallend ist, daß die Bindungsstellen vor allem an der Zellmembran lokalisiert sind und zwar mehrheitlich sowohl an der apikalen als auch an der basolateralen Zellmembran. Lediglich HPA und PNA wurden nur an der apikalen Zellmembran nachgewiesen. Während der Laktation werden HPA und SBA aber auch intrazytoplasmatisch gebunden, wie dies Calafat und Janssen (1983) im Falle von HPA bei Tumoren der menschlichen Brustdrüse beschreiben. Wenn eine positive Reaktion betont an der Epithelbasis auftritt, ist zu vermuten, daß sie im Bereich der Basalmembran lokalisiert ist. Die Vielfalt der nachgewiesenen Lektinbindungsstellen deutet auf eine Vielfalt von Glycokomponenten in der Membran dieser Zellen. Die folgenden schematischen Darstellungen zeigen einerseits die gefundenen Lektinbindungsstellen in ihrer Verteilung ent-

lang der Plasmamembran und andererseits die entsprechenden Zucker.



Verteilung der Lektinbindungsstellen (a) an Mammaepithelzellen der Ratte und der entsprechenden Zucker (b) an der apikalen und basolateralen Zellmembran

K = Zellkontakte, E = Gefäßendothel

Da die Kohlenhydratanteile der Membranglykoproteine wichtige Funktionsträger der Zellmembran sind, zeigen die vorgelegten Befunde eindrucksvoll die funktionelle Wichtigkeit dieser Membran. In Übereinstimmung mit den Befunden an Membranen anderer Zellen (Goldstein und Hayes 1978, Brown und Hunt 1978) dürfte zumindest ein Teil der nachgewiesenen Kohlenhydrate Rezeptorstrukturen markieren und auf eine Fülle rezeptorvermittelter Aktionen hinweisen. Interessant ist, daß die vorliegenden Befunde nachdrücklich zeigen, daß nicht nur die

apikale, sondern auch die basolaterale Membran vermutlich zahlreiche Rezeptorstrukturen enthält. Die physiologische Bedeutung der basolateralen Rezeptoren ist einsichtig, da diese Membran dem Bindegewebsraum zugewandt ist, aus dessen Blutkapillaren z.B. Hormone kommen, deren Ziel das Mammaepithel ist. Schwerer zu verstehen ist die Fülle möglicher Rezeptoren in der apikalen Membran. Es scheint aber nicht auszuschließen zu sein, daß unter diesen Rezeptoren solche sind, über die die Hemmung der Milchsekretion erfolgt. Diese Vermutung würde die Annahme von Hendersons und Peaker (1984) stützen, daß die Hemmung der Milchsekretion nicht - wie oft vermutet - mittels einfacher Dehnung des Epithels erfolgt, sondern, daß die Milch selbst einen Inhibitor enthält. Dieser könnte mittels eines Rezeptormechanismus der apikalen Membran an die Epithelzellen gebunden und in sie aufgenommen werden. Die Natur dieses Inhibitors ist bisher nicht bekannt, grundsätzlich kommen alle Substanzen in Frage, die an die Membran gebunden werden können, z.B. Peptide, Calcium oder Steroide. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß Patton et al. (1980a) beobachteten, daß gegen die MilCHFettkugelmembran gerichtete Antikörper, die über die Gänge der Zitzen in das Euter infundiert werden, bei Ziegen die Milchsekretion in beträchtlichem Ausmaß hemmen. Ob auch die im Rahmen einer Mastitis zu beobachtende behinderte Milchsekretion durch Antikörperanlagerung an die apikale Membran verursacht wird, ist nicht bekannt. Die natürlicherweise in der Milch vorkommenden Immunglobuline scheinen diesen Effekt nicht zu haben. Hier wären weitere Studien von Interesse.

Um zu entscheiden, ob die in dieser Untersuchung nachgewiesenen Lektinbindungsstellen Teil eines Hemm-Mechanismus der Milchsekretion sind, müßten Experimente mit einer Blockierung dieser Bindungsstellen durchgeführt werden, was in vitro sicherlich einfacher als in vivo ist. Auch aus diesem Grunde sind die jetzt vorgelegten in vitro-Untersuchungen und -Befunde wichtig. Weiterhin wäre abzuklären, ob die nachgewiesenen Kohlenhydrate in der apikalen Membran ganz unabhängig

von irgend welchen Rezeptormechanismen Bedeutung für die Ernährung der neugeborenen Säuger besitzen, da sie ja in die Membran der Milchfettkugeln eingehen und so Komponente der Milch werden.

Von grundsätzlicher methodischer Bedeutung ist, daß in der vorliegenden Studie die Lektinbindungsstellen sowohl an Paraplastschnitten (entsprechen Paraffinschnitten) und an Gefrierschnitten untersucht wurden. Bei unfixierten Kryostat-schnitten ist es nach Schünke et al. (1984) möglich, daß bei Inkubation mit Lektinlösungen oder beim Spülen leicht lösliche Glykoproteine verloren gehen. Bei der chemischen Fixierung andererseits ist nicht auszuschließen, daß die Struktur der Glycoproteine und damit auch ihr Lektinbindungsverhalten verändert wird. Entsprechend sind aufgetretene Unterschiede zwischen Lektinreaktionen an Bouin-fixierten und unfixierten Schnitten zu werten. Bei der Wahl der Fixierungsmethode sollte auf eine möglichst weitgehende Erhaltung der natürlichen Lektinbindungsstellen und auf geringe Störung durch Autofluoreszenz geachtet werden. Die Meinung über die richtige Wahl ist bei den einzelnen Autoren recht unterschiedlich. Während unserer Meinung nach Ergebnissen an unfixierten Gefrierschnitten eine größere Aussagekraft zuzuschreiben ist als den bei chemisch fixiertem Gewebe erhobenen Befunde, halten Louis et al. (1983) für ihre Untersuchungen an menschlichen Mammakarzinomen Kryostatschnitte für ungeeignet. Mazzuca et al. (1982) haben bei der Anwendung einer Fixierung nach Carnoy bei menschlichen Bronchialdrüsen besonders klare Befunde, während Nakagawa et al. (1985) bei der Lokalisation von Glycoconjugaten in der Hypophyse der Ratte nach Carnoy-Fixierung schlechte Ergebnisse erhielten und ein HgCl_2 -gepuffertes Glutaraldehyd für besonders geeignet halten. Meiner Ansicht nach sollten bei der Milchdrüse sowohl Bouin-fixierte Gewebeschnitte, als auch unfixierte Kryostatschnitte analysiert werden. Es fand sich z.B. auf Gefrierschnitten von 8 bis 10 Tage laktierenden Drüsen eine positive Reaktion der interalveolaren Kapillaren mit dem Lektin DBA und den beiden

Isolektinen GSA-I und GSA-IB₄, während bei Paraffinschnitten die Reaktion negativ verlief. In diesem Fall, der wegen der Charakterisierung der Kapillarendothelien Beachtung verdient, könnte der gesamte Prozess der chemischen Fixierung und der Einbettung die Lektinbindungsstellen zerstört oder so verändert haben, daß ihre terminalen Saccharidkomponenten nicht mehr zugänglich sind. Da über die Lektinbindungsstellen von GSA-I und GSA-IB₄ bekannt ist, daß sie in Basallaminae (Peters und Goldstein 1979) oder apikalen Membranen von Epithelzellen und schleimbildenden Zellen vorkommen (Schumacher et al. 1986), ist es nicht sehr wahrscheinlich, daß sie Teile von Glykolipiden sind, die bei der Einbettung herausgelöst wurden.

Es gibt nur wenige Vergleichsmöglichkeiten zwischen unseren Befunden an der Ratte mit Befunden an der menschlichen Brustdrüse. Walker (1984a, b, c) beschreibt die Bindung von Peroxidase-markierten Lektinen am menschlichen Brustdrüsenepithel sowohl an der ruhenden Mamma als auch an hyperplastischem Gewebe, an Mammarkarzinomen (Walker 1984b, c) und auch an laktierenden Drüsen (Walker 1984a). Während die Bindungsmuster der Lektine WGA, SBA und DBA mit unseren Befunden an der laktierenden Ratte weitgehend übereinstimmen, tritt bei der Ratte eine starke apikale Färbung bei Alveolar- und Gangepithelzellen mit PNA auf, die beim Menschen entweder nicht oder nur an wenigen Stellen auftritt, außer es erfolgt eine Vorbehandlung mit Neuraminidase. Mit UEA werden bei der Frau alle Alveolen apikal gefärbt und auch die Gefäßendothelien jedenfalls an Gefrierschnitten oder an trypsinisiertem Formalinfixiertem Gewebe. Bei der Ratte dagegen ergibt UEA-I vorwiegend eine basale Reaktion, die in den Alveolen schwach, in den Gängen dagegen stärker ist.

Es wäre von großem Interesse herauszufinden, ob es innerhalb der Säugetiere speziesspezifische Bindungsstellen an den Mammaepithelzellen gibt und z.B. alle Haustiere, deren Milch - die ja Membranmaterial enthält - genutzt wird, mit dem Menschen zu vergleichen. Dies könnte u.a. Hinweise auf die wei-

ter oben angedeutete, möglicherweise ernährungsrelevante Bedeutung der Zucker und auch auf Unverträglichkeiten der Milch von Tieren geben.

Die apikale Membran der Alveolarepithelzellen weist nach unseren Befunden eine etwas größere Anzahl von Lektinbindungsstellen auf als diejenige der Gangepithelzellen. Dies gilt insbesondere für die Lektine Con A, GSA-IB₄ und PHA-L. Im Gegensatz dazu aber wird DBA an der apikalen Membran der Gangepithelzellen stärker gebunden, was unter Umständen auch funktionell von Interesse ist, da die Sekretionsleistungen der Gangepithelien bisher noch nicht so intensiv untersucht wurden wie die der Alveolen. Zu der oft stark positiven Reaktion an der Basis der Drüsengänge dürften Lektinbindungsstellen in der Basallamina wesentlich beitragen, wofür auch die auf Querschnitten beobachtete Verzahnung der basalen fluoreszierenden Zone mit dem Myoepithel spricht. Eine ganz ähnliche Konfiguration beobachteten Warburton et al. (1982), die mit Antisera gegen Kollagen IV und Laminin den typischen Verlauf der Basallamina in der Milchdrüse der Ratte dargestellt haben. Die Bindung von Lektinen an die Basallamina dürfte u.U. auch diagnostisch von Bedeutung sein, da vor einer Invasion neoplastischer Milchdrüsenzellen in das umgebende Milchdrüsengewebe die Basallamina durch Proteasen angegriffen wird (Liotto et al. 1980).

Einzelne Studien an Mammakarzinomen vermitteln den Eindruck, daß die Plasmamembran der Karzinomzellen ein anderes Lektinbindungsmuster zeigen als normale oder hyperplastische Mam-mazellen. Newman et al. (1979), Vierbuchen et al. (1981), Klein et al. (1983), Louis et al. (1983), Lloyd et al. (1984), Peachey and Smolira (1984) halten speziell PNA für einen wertvollen Tumormarker von Mammakarzinomen. Louis et al. (1983) fanden im Gegensatz zu normalem Gewebe an verschiedenen malignen epithelialen Mammaläsionen Bindung von Con A, LCA (Lenculinaris Agglutinin), PNA, DBA, GSA, MPA (Machura pomifera Agglutinin), WGA, TPA (Tetragonolobus purpureus Agglutinin),

UEA war stets negativ. Unveröffentlichte Beobachtungen an normalem laktierendem Gewebe der Frau (Welsch, Gent und Patton) und die vorgelegten Befunde an der Ratte lassen es als unwahrscheinlich erscheinen, daß die behauptete Spezifität von Con A, PNA, DBA, GSA und WGA für Mammarkarzinomen tatsächlich existiert, da in unserem Labor diese Lektine auch mit normalem Gewebe eine Bindung eingehen. Wir stehen der behaupteten Karzinomspezifität von Lektinen kritisch gegenüber, können aber nicht ausschließen, daß bisher unbekannte technische Unterschiede bei den Nachweisen die unterschiedlichen Ergebnisse bedingen und LCA, MPA sowie TPA haben wir nicht untersucht. Der Bedeutung des am häufigsten als Tumormarker angesehenen Lektins, des PNA, das sich an die Antigenkomponente des Thomsen Friedenreich Antigens bindet, stehen auch Böcker et al. (1984) kritisch gegenüber.

Die vorliegende Untersuchung hat als ein Nebenergebnis gezeigt, daß das sich ausdifferenzierende und laktierende Milchdrüsengewebe der Ratte reich an Mastzellen ist. Diese Zellen lassen sich stets in gefäßführenden Bindegewebsstrukturen in Nähe von Drüsenepithelien finden. Diese Lokalisierung erscheint funktionell sinnvoll zu sein, da Sekrete der Mastzellen Gefäßerweiterungen und Gefäßdurchlässigkeiten beeinflussen (siehe Forth, Henschler, Rummel 1984). Die hier erhobenen Befunde deuten auf eine wichtige Rolle der Mastzellen bei der Durchblutung des Drüsengewebes und damit auch bei der Stoffzufuhr zum sekretorischen Gewebe. Ob diese Zellen auch die in reichem Maße vorhandene Oxytocin-sensitive glatte Muskulatur der Drüsenepithelien anspricht, ist meines Wissens nicht untersucht.

Unsere Befunde zum Fettgewebe stimmen mit den bekannten Tatsachen zur Fettverteilung im Mammagewebe des Menschen überein (Dabelow 1957).

Über die Ultrastruktur der Milchdrüse gibt es bereits eine umfassende Literatur (Bargmann 1961, Hollmann 1974, Bässler 1978). Es sollen hier deshalb nur die apokrine Sekre-

tion der MilCHFettkugeln, die Caseinsekretion sowie das Vorkommen sogenannter "heller Zellen" kurz diskutiert werden. Der Beginn der Lipidsynthese ist rein morphologisch nicht erkennbar, sie soll zwischen den Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums erfolgen. Infolge Woodings (1971) werden die Lipidtropfen schon im Zytoplasma von einer sogenannten primären Membran umgeben, die vom glatten endoplasmatischen Retikulum stammen soll. Bei der Ausschleusung aus der Zelle wird sie zusätzlich von Zytoplasmaresten, die Mitochondrien, ER-Anteile und freie Ribosomen enthalten können, und von der apikalen Plasmamembran umgeben. Bei der Lektinbindungsreaktion an Schnitten durch MilCHFettkugeln ist daher die Existenz solcher Zytoplasmareste zu berücksichtigen, die Bindungsorte werden aber im wesentlichen an der MilCHFettkugelmembran vorkommen. Während der Gravidität fällt auf, daß sich die Ultrastruktur der Caseinmizellen deutlich von der in laktierenden Zellen (Buchheim und Welsch 1973) unterscheidet. Die besondere Morphologie dieser Mizellen vor der Geburt ist auch von Murad (1970) beobachtet worden, ihre Bedeutung ist unbekannt. Erwähnt werden soll noch, daß in der Gravidität die Nähe von kleinen dichten Vesikeln mit wahrscheinlich unreifem Casein zu Lipidfettkugeln auffällt. Die Frage, ob diese räumliche Nähe als Hinweis für die Nachbarschaft ihrer Entstehungsorte gelten könnte, muß offen bleiben. Die von Bässler (1978) in EM-Studien beschriebenen "hellen Zellen", die Neurosekretgranula enthalten sollen, werden von Jaski et al. (1985) in der laktierenden Milchdrüse der Ratte als dendritische Zellen bezeichnet. Sie werden mit den dendritischen Zellen des lymphatischen Gewebes und den Langerhans-Zellen der Haut verglichen und sollen nach Meinung der Autoren immunologisch eine Rolle in der Milchdrüse spielen. Entsprechende Zellen wurden in der vorliegenden Untersuchung nicht beobachtet. Die mitunter gesehenen "hellen" Zellen sind meiner Auffassung nach möglicherweise unreife Epithelzellen; wenn freie Zellen im Epithel gefunden wurden, handelte es sich um Lymphozyten und an Makrophagen erinnernde

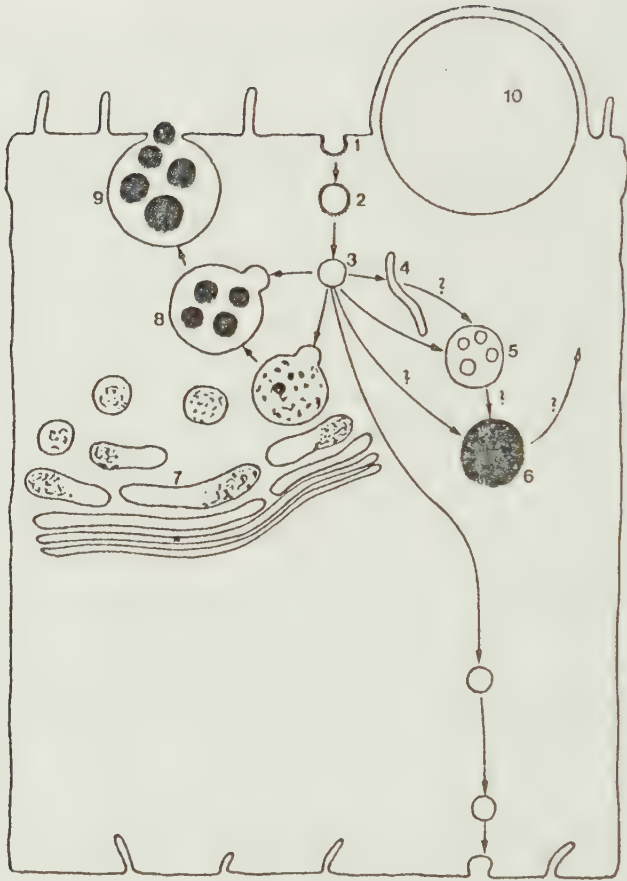
Zellen. Zellen mit morphologischen Merkmalen der Langerhans-Zellen (Birbeck-Granula, Kernmorphologie u.a.) wurden nicht gesehen.

Ein Vergleich der *in vivo*- und *in vitro*-Aufnahme von WGA-FITC in Milchdrüsenepithelzellen zeigt, daß die Aufnahme *in vitro* offenbar viel rascher erfolgt. Während *in vivo* 10 Minuten nach Infusion von WGA-FITC zwar eine apikale Bindung des Lektins in den Alveolen und Gängen erfolgt und auch eine geringfügige intrazelluläre Aufnahme nachweisbar ist, war *in vitro* bereits nach einer Minute Inkubation mit WGA-FITC eine intrazytoplasmatische Aufnahme in Form granulärer Strukturen in einem Teil der Zellen erkennbar, nach 5 Minuten war in allen Zellen eine intrazelluläre Aufnahme des Lektins nachweisbar. Es sieht also fast so aus, als fiele *in vitro* eine gewisse Hemmung der apikalen Endozytose fort, deren Mechanismus aber unklar bleibt. Die vorliegenden Beobachtungen weisen darauf hin, daß in Einzelheiten, wie hier z.B. der Aufnahmegeschwindigkeit, das *in vivo*- und *in vitro*-Verhalten der Mammaspithelzellen durchaus unterschiedlich sein kann, daß aber grundsätzliche Befunde, die das Phänomen des Membranrecycling betreffen, durchaus *in vitro* durchgeführt werden können.

Die jetzt erhobenen WGA-Bindungs- und Aufnahmestudien (licht- und elektronenmikroskopisch, *in vivo* und *in vitro*) werden folgendermaßen interpretiert: Es kommt sehr rasch (mindestens nach 5 bis 10 Minuten *in vivo*, nach 1 Minute *in vitro*) zu einer intensiven Bindung des verwendeten Lektins an die apikale Plasmamembran und zwar sowohl an Mikrovilli als auch an glatte Membranareale. Bereits nach 5 Minuten sind Endozytosefiguren ausgebildet, unter denen sich auch coated pits befinden. Wenn ein Clathrin-Belag der Einsenkungen nicht eindeutig erkannt werden kann, handelt es sich vermutlich um einen Schnitteffekt. Apikal lokalisierte Endozytosevesikeln sind glatt, so daß vermutet werden kann, daß der Clathrin-Belag rasch wieder abgelegt wird. Ob WGA auch mittels glatter Endozytosefiguren ("fluid

phase endocytosis") aufgenommen wird, erscheint recht unwahrscheinlich. Es könnte aber auch an eine Aufnahme in tubuläre Elemente, die von der Basis der Mikrovilli ausgehen, gedacht werden, wie sie Fine und Ockleford (1984) bei der Aufnahme von IgG in Zellen des Dünndarms beschreiben, von wo aus das markierte Lektin zu Lysosomen gebracht werden könnte und dort vom Bindungsort gelöst und abgebaut wird, während die Membranproteine durch Recycling wieder der apikalen Plasmamembran zugeführt werden könnten. Die vorliegende Untersuchung hat für den Weg von Lysosomen zurück zur Plasmamembran keine Hinweise ergeben. Markiertes WGA findet sich im Zytoplasma der laktierenden Epithelzellen vor allem:

1. in schlauchförmigen Membransystemen (?prälysosomanles Kompartiment, Farquhar 1983, Herzog 1984), 2. in multivesikulären Körpern und 3. in jungen und ausgereiften Caseinvesikeln. Nicht ganz sicher ist, ob das WGA auch in typisch sekundäre Lysosomen transportiert wird, wie das im Fall anderer Lektine in anderen Zellen nachgewiesen wurde. Die Unsicherheit im Falle der Rattenmilchdrüsenzellen beruht darauf, daß in sekundären Lysosomen zwar distinkte ferritinähnliche Partikel gefunden wurden, die aber morphologisch nicht völlig den typischen Ferritinpartikeln gleichen, sondern etwas variabler in ihrem Umriß und ihrer Größe erscheinen. Unsere Befunde, die auf der folgenden Abbildung zusammengefaßt sind, zeigen also, daß in den laktierenden Zellen ein Weg des Membranrecyclings existiert, der im wesentlichen auf das apikale Zytoplasma beschränkt ist und die typischen Golgizisternen nicht mit umfaßt.



Schematische Darstellung des intrazellulären Transportes von WGA

1 coated pit, 2 coated vesicle, 3 glattes Vesikel, 4 Endosom, 5 multivesikulärer Körper, 6 sekundäres Lysosom, 7 Golizisterne mit einer Vorstufe von Casein, 8 Casein-Vesikel, das mit glatten Vesikel konfluiert, 9 Exocytose von Casein, 10 Milchfettkugel

Damit besteht ein deutlicher Unterschied zu den Verhältnissen wie sie z.B. von Paavola et al. (1985) bei Granulosa-zellen der Ratte beschrieben werden. Vielleicht existiert in der laktierenden Drüsenzelle, die einen besonders hohen Membranzumsatz hat, ein sehr kurzer Weg eines Membranrecyclings, der im wesentlichen nur apikale Plasmamembran, Endozytosevesikel und Caseinvesikel umfaßt. Die Bedeutung der Aufnahme in multivesikuläre Körper, die auch im Falle von Con A zu beobachten ist (Welsch et al. 1984a), ist unklar. Die multivesikulären Körper sind oft PAS-positiv und enthalten saure Phosphatasen (Review, siehe Herzog 1984), andererseits soll es auch multivesikuläre Körper geben, die PAS-negativ sind und die in die Region des Golgi-Apparates transportiert werden, wo saure Hydrolasen zugefügt werden (Paavola et al. 1985), was nach Meinung der Autoren zur Bildung von dichten PAS-positiven multivesikulären Körpern führen könnte. Damit wäre denkbar, daß in den multivesikulären Körpern der lysosomale Abbau von WGA-Ferritin eingeleitet wird. Im Vergleich mit der Aufnahme von Con A in laktierende Mammaepithelzellen (Welsch et al. 1984a) ergibt sich, daß WGA, das eine andere Zuckerspezifität als Con A besitzt, grundsätzlich in ähnlicher Weise gebunden und aufgenommen wird. Sogar im basalen Zytoplasma fanden sich bei den Con A- und WGA-Versuchen markierte kleine Vesikel, die auf transzytotische Prozesse von apikal nach basal in laktierenden Milchdrüsenepithelzellen hinweisen, deren Bedeutung aber unklar ist. Daß eine solche Transzytose stattfindet, dafür spricht auch das Auftreten einer Fluoreszenz an den subepithelialen Blutkapillaren. Dieser Befund bedarf jedoch der Abklärung, da nicht ganz sicher ausgeschlossen werden kann, daß das markierte WGA bei der Infusion durch kleine Epithelläsionen in den Bindegewebsraum gelangt. Ein Unterschied zwischen Con A und WGA-Aufnahme besteht darin, daß Con A apikal in deutlich größeren Mengen aufgenommen wird als WGA, und daher möglicherweise an ein Membranglykoprotein gebunden wird, das für das Membranrecycling von besonderer Bedeutung ist. Andererseits beschreiben Kramer

und Canellakis (1979) eine Stimulation der Endozytose mit WGA bei HeLa-Zellen, die jedoch mesodermale Zellen sind.

Die Endozytoserate ist vermutlich vom Zelltyp, vom verwendeten Lektin sowie möglicherweise auch davon abhängig, ob der Versuch in vivo oder in vitro durchgeführt wird. Abschließend sei darauf hingewiesen, daß die vorliegende kombinierte licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung der Lektinbindung und -aufnahme gezeigt hat, daß nach grundsätzlicher elektronenmikroskopischer Klärung der Bindungs- und Aufnahmeorte die entsprechenden lichtmikroskopischen Studien wertvolle Ergebnisse liefern, die sich vor dem Hintergrund elektronenmikroskopischer Kenntnisse auch gut interpretieren lassen.

.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Lektinen verschiedener Zuckerspezifität an Bouin fixierten Schnitten und an unfixierten Kryostatschnitten der Mammaepithelien (während der Gravidität, 2 Stunden post partum, 8 bis 10 Tage laktierend) das Bindungsverhalten untersucht. An der apikalen Zellmembran wurden während der Gravidität Bindungsstellen folgender Lektine (mit Zuckerspezifität) beobachtet: Con A (α -D-Glc, α -D-Man), DBA (α -D-GalNAc, D-Gal), HPA (α -D-GalNAc), PNA [D-Gal- β -(1-3)GalNAc], RCA-I (β -D-Gal und WGA [β -(1-4)D-GlcNAc]₂. An der basolateralen Zellmembran fehlt dieser Liste nur eine positive Reaktion für PNA [D-Gal- β -(1-3)GalNAc]. Während der Laktation wurden apikal und basolateral zusätzliche Bindungsstellen von GSA-I B₄ (α -D-Gal) und UEA-I (α -L-Fucose) nachgewiesen. Als besonderer Befund ergibt sich unter anderem, daß das Mammaepithel im Gegensatz zu anderen Epithelien im Laufe der Ausdifferenzierung ein konstantes besonders vielfältiges Lektinbindungsmuster aufweist.

Außer der Bindung von Lektinen an die Plasmamembran wurde auch die Aufnahme des Lektins WGA in Milchdrüsenepithelzellen in vivo und in vitro untersucht. FITC-markiertes WGA ist in vitro schon nach den ersten Minuten der Inkubation nicht nur an die Plasmamembran gebunden, sondern bereits intrazytoplasmatisch in granulären Strukturen nachweisbar, deren Zahl mit der Zeit zunimmt und die sich von der Zellperipherie nach zentral in Kernnähe verlagern. In vivo wurde WGA-FITC 10 Minuten nach Infusion außer an der apikalen Plasmamembran auch im Zytoplasma nachgewiesen. Intrazytoplasmatische fluoreszierende Einschlüsse wurden zu späteren Zeiten auch weiter basal gefunden und nach einer halben Stunde fluoreszierten die Blutkapillaren basal der Drüsenepithelzellen schwach und nach einer Stunde etwas stärker. Im Gegensatz dazu war eine halbe Stunde nach Infusion von Con A-FITC keine Fluoreszenz in Kapillaren erkennbar.

Der Nachweis der Bindung von WGA an die Plasmamembran sowie seine intrazelluläre Aufnahme wurde auch elektronenmikroskopisch untersucht durch Verwendung von Ferritin-konjugiertem Lektin. WGA-Ferritin war 5 Minuten nach Infusion an die apikale Plasmamembran gebunden und teilweise auch schon in apikalen runden Vesikeln ($\varnothing$ ca. 75 nm) oder in länglichen Endosomen zu finden, deren Anzahl nach 10 Minuten zugenommen hatte. Eine Stunde nach Infusion ließen sich Ferritinpartikel vereinzelt auch in basal gelegenen kleinen Vesikeln nachweisen, was ein Hinweis für eine, wenn auch geringfügige, Transzytose von WGA-Ferritin sein könnte. Die Bindung von WGA-Ferritin an die apikale Membran führt auch zur Bildung von coated pits. Offenbar wird aber die Clathrinhülle sehr rasch abgelöst, so daß Ferritinpartikel nur in glattwandigen Vesikeln gefunden wurden. Außer in apikalen und vereinzelt auch basalen kleinen Vesikeln mit Ferritin wird dieses auch in Caseinvesikeln und in multivesikulären Körpern nachgewiesen. Vermutlich wird es auch in dichten sekundären Lysosomen eingelagert, in denen es jedoch morphologisch nicht ganz zweifelsfrei nachweisbar ist. Die Versuche mit dem WGA lassen vermuten, daß in den laktierenden Epithelzellen der Mamma, die einen sehr intensiven Membranumsatz haben, das Membranrecycling im wesentlichen auf den Zellapex beschränkt ist und vermutlich den Golgiapparat nicht mit einschließt.

Da sich Experimente besonders gut an in vitro gezüchteten Zellen durchführen lassen, wurden in Anlehnung an die Methode von Emerman und Pitelka (1977) Bedingungen erarbeitet, bei denen Milchdrüsenzellen gravider Ratten eine zusammenhängende Zelllage auf der Oberfläche von Kollagenschichten oder alveolenähnliche Zellansammlungen in deren Inneren bilden. Um den Differenzierungsgrad der Milchdrüsenzellen in Kultur besser beurteilen zu können, wurde deren Feinstruktur elektronenmikroskopisch kontrolliert. Auch zu den Zeitpunkten der Graviddität und Laktation, an denen die Lektinbindungsreaktionen an Schnitten lichtmikroskopisch durchgeführt wurden, wurde der Differenzierungsgrad der Drüsenzellen an Gewebeproben von denselben Drüsen elektronenmikroskopisch analysiert.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ainsworth, S. K., Karnovsky, M. J.: An ultrastructural staining method für enhancing size and electron opacity of ferritin in thin sections. *J. Histochem. Cytochem.* 20, 225 - 229 (1972)
- Bargmann, W., Fleischhauer, K., Knoop, A.: Über die Morphologie der Milchsekretion II. Zugleich eine Kritik am Schema der Sekretionsmorphologie *Z. Zellforsch.* 53, 545 - 568 (1961)
- Bässler, R.: Pathologie der Milchdrüse. In: Spezielle pathologische Anatomie (Eds. Doerr, W., Seifert G., Uehlinger) Springer Berlin-Heidelberg-New York 1978
- Böcker, W., Klaubert, A., Bahnsen, J., Schweikhart, G., Pollow, K., Mitze, M., Kreienberg, R., Beck, T., Stegner, H.-E.: Peanut lectin histochemistry of 120 mammary carcinomas and its realtion to tumor typ, grading, staging and receptor status *Virchow A* 404, 149 - 161 (1984)
- Borisch, B.: Immunhistochemische Untersuchungen an Tumoren mit *Ulex europaeus* Agglutinin I, insbesondere Untersuchungen an Weichgewebstumoren des Menschen Inauguraldissertation Ch.-A. Universität Kiel (1984)
- Brown, Y. C., Hunt, R.C.: Lectins. In: Intern. Rev. Cytol. 52, 277 - 349 (Eds. Bourne, G. H., Danielli, J. F.) Academie Press, New York, San Francisco, London (1978)
- Buchheim, W., Welsch, U.: Evidence for submicellar composition of casein micelles on the basis of electron microscopical studies. *Neth. Milk Dairy J.* 27, 163 - 180 (1973)
- Calafat, J., Janssen H.: Ultrastructural study on the presence of receptors for several lectins in human breast cancer. In: Lectins Vol. 3, 119 - 129 (Eds. Bøgg-Hansen, T. C., Sprengler, G. A.) de Gruyter, W., Berlin, New York (1983)
- Calafat, J., Hageman, P. C., Janssen, H.: Ultrastructural localization of peanut agglutinin receptors on cells of human mammary tumors. In: Lectins Vol. 3, 131 - 143 (Eds. Bøgg-Hansen, T. C., Spengler, G. A.) de Gruyter, W., Berlin, New York (1983)
- Currie, J.R., Maylié-Pfenninger, M.-F., Pfenninger, K. H.: Developmentally regulated plasmalemmal glycoconjugates of the surface of neural ectoderm *Dev. Biol.* 106, 109 - 120 (1984)

- Dabelow, A.: Die Milchdrüse. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Band III/3, 277 - 485 (Eds. Horstmann, E., Dabelow, A.) Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1957)
- Emerman, J. T., Pitelka, D. R.: Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes In Vitro 13, 316 - 328 (1977)
- Farquhar, M. G.: Multiple pathways of exocytosis, endocytosis and membran recycling: validation of a Golgi route Federation Proceedings 42, 2407 - 2413 (1983)
- Fine, R. E., Ockleford, C.D.: Supramolecular cytology of coated vesicles. In: Int. Rev. Cytol. 91, 1 - 43 (Eds. Bourne, G. H., Danielli, J. E.) Academic Press, INC (1984)
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. (Eds.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftsverlag (B.I.) Mannheim, Wien, Zürich (1984)
- Goldstein, I. J., Hayes, C. E.: The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 35, 127 - 340 (1978)
- Henderson, A.J., Peaker, M.: Feed-back control of milk secretion in the goat by a chemical in milk. J. Physiol. 351, 39 - 45 (1984)
- Herzog, V.: Pathways of endocytosis in thyroid follicle cells. Int. Rev. Cytol. 91, 107 - 139 (Eds. Bourne, G. H., Danielli, J. E.) (1984)
- Hollmann, K. H.: Cytology and fine structure of the mammary gland. In: Lactation I: The mammary gland. Development and maintenance 3 - 95 (Eds. Larson, B. L., Smith, V. R.) Academic Press New York, London (1974)
- Jaski, K., Monaghan, P., Neville, A. M.: Ultrastructural identification of Ia positive dendritic cells in the lactating rat mammary gland. Virchows A 406, 17 - 25 (1985)
- Klein, P. J., Vierbuchen, M., Fischer, J., Schulz, K.-D., Farrar, G., Uhlenbruck, G.: The significance of lectin receptors for the evaluation of hormone dependence in breast cancer. J. steroid Biochem. 19, 839 - 844 (1983)

- Kocourek, J., Horejsi, V.: A note of the recent discussion on definition of the term "Lectin". In: Lectins Vol. 3, 3 - 6 (Eds. Bøg-Hansen, T. C., Spengler, G. A.) de Gruyter, Berlin, New York (1983)
- Kramer, R. H., Canellakis, E.S.: The surface glycoproteins of HeLa cell. Internalization of wheat germ agglutinin-receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 551, 328 - 348 (1979)
- Liotta, L. A., Tryggrason, K., Garisa, S., Hart, I., Folz, C. M., Shafie, S.: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284, 67 - 68 (1980)
- Lloyd, R., Foley, J., Judd, W. J.: Peanut lectin agglutinin and α -lactalbumin. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 108, 392 - 395 (1984)
- Louis, C. J., Sztynka, F. T., Cheng, Z. M., Wyllie, R. G.: Lectin-binding affinities of human breast tumors. *Cancer* 52, 1244 - 1250 (1983)
- Malmi, R., Söderström, K.-O., Karjalainen, K.: Labeling of rat spermatogenic cells with fluorescein isothiocyanate conjugated lectins. In: Lectins Vol. 3 327 - 333 (Eds. Bøg-Hansen, T. C., Spengler, G. A.) de Gruyter, Berlin, New York (1983)
- Mazzuca, M., Lhermitte, M., Lafitte, J.-J., Roussel, P.: Use of lectins for detection of glycoconjugates in glandular cells of human bronchial mucosa. *J. Histochem. Cytochem.* 30, 956 - 966 (1982)
- Michalopoulos, G., Pitot, H. C.: Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. *Exp. Cell Res.* 94, 70 - 78 (1975)
- Mowry, R. W.: Observations on the use of sulphuric ether for the sulphation of the hydroxyl groups in tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 4, 407 (1956)
- Müller, E., Schröder, C., Franco, M. W., Ashok, K. S., Schauer, S. R.: Involvement of a β -Galactose-specific macrophage lectin in binding and phagocytosis of erythrocytes. In: Lectins Vol. 3, 435 - 442 (Eds. Bøg-Hansen, T. C., Spengler, G. A.) de Gruyter, Berlin, New York (1983)
- Murad, T. M.: Ultrastructural study of rat mammary gland during pregnancy. *Anat. Rec.* 167, 17 - 36 (1970)

- Nakagawa, F., Schulte, B. A., Spicer, S. S.: Glycoconjugate localization with lectin and PA-TCH-SP Cytochemistry in rat hypophysis. *Am. J. Anat.* 174, 61 - 81 (1985)
- Nemanic, M. K., Wittehead, J. S., Elias, P. M.: Alterations in membrane sugars during epidermal differentiation. *J. Histochem. Cytochem.* 31, 887 - 897 (1983)
- Newman, R. A., Klein, P. J., Rudland, P. S.: Binding of peanut lectin to breast epithelium, human carcinomas and a cultured rat mammary stem cell: Use of the lectin as a marker of mammary differentiation. *J. natn. Cancer Inst.* 63, 1339 - 1346 (1979)
- Nicolson, G. L.: The interaction of lectins with animal cell surfaces. In: *Int. Rev. Cytol.* Vol. 39, 89 - 190 (Eds. Bourne, G. H., Danielli, J. F.) Academic Press New York, San Francisco, London (1974)
- O'Brien, T. L., Riss, T. L., Baumrucker, C. R.: Ultrastructure of collagenase-isolated acini (alveoli) from lactating mammary tissue. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 100(3), 306 - 315 (1981)
- Paavola, L. G., Strauss III, J. F., Boyd, C. O., Nestler, J. E.: Uptake of gold- and (³H) cholesteryl linoleate-labeled human low density lipoprotein by cultured rat granulosa cells: cellular mechanism involved in lipoprotein metabolism and their importance to steroidogenesis. *J. Cell Biol.* 100, 1235 - 1247 (1985)
- Patton, S., Keenan, T. W.: The milk fat globule membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 415, 273 - 309 (1975)
- Patton, S., Bogus, E. R., Stemberger, B. H., Trams, E. G.: Antiserum to the milk fat globule membrane. Preparation and capacity to suppress milk secretion. *Biochim. Biophys. Acta* 597, 216 - 223 (1980a)
- Patton S., Stemberger, B. H., Horton, A., McCarl, R. L.: Suppression of milk secretion (exocytosis) by concanavalin A in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 630, 530 - 536 (1980b)
- Patton, S., Hubert, J.: Binding of concanavalin A to milk fat globules and release of the lectin-membrane complex by triton X-100. *J. Dairy Sci.* 66, 2321 - 2319 (1983)
- Patton, S., Welsch, U., Singh, S.: Intramammary infusion technique for genetic engineering of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 67, 1323 - 1326 (1984)

- Peachey, L. A., Smolira, M. A.: The use of colloidal gold complexes in an ultrastructural study of lectin-binding sites and matrix deposition on normal human primary breast epithelium on collagen gels. *Histochem. J.* 16, 819 - 834 (1984)
- Peters, B. P., Goldstein, I. J.: The use of fluorescein conjugated *Bandeiraea simplicifolia* B₄-isolectin as histochemical reagent for -D-galactopyranosyl groups. *Exp. Cell Res.* 120, 321 - 326 (1979)
- Renau-Piqueras, J., Miragall, F., Cervera, J.: Endocytosis of cationized ferritin in human resting peripheral blood by T-lymphocytes. *Cell Tiss. Res.* 240, 743 - 746 (1985)
- Reutter, W.: Glykokonjugate der Zelloberfläche als Informationsträger. *Verhandlungen der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte*, 113. Vers. Nürnberg S. 371 - 380 (1984)
- Saacke, R. G., Heald, C. W.: Cytological aspects of milk formation and secretion. In: *Lactation II Biosynthesis and secretion of milk* 147 - 189 (Eds. Larson, B. L., Smith, V. R.) Academic Press New York, London (1974)
- Sasaki, M., Keenan, T. W.: Ultrastructural characterization of carbohydrate distribution on milk lipid globule membrane. *Cell Biol. Int. Rep.* 3, 67 - 74 (1979)
- Schünke, M., Schumacher, U., Tillmann, B., Welsch, U.: Lektinbindungsstellen in Stützgeweben. *Verh. Anat. Ges. Anat. Anz.* (in press)
- Schumacher, U., Welsch, U., Barth, J.: The distribution of carbohydrate components as revealed by lectin histochemistry in the alimentary tract of truffles. *Lectins Vol. 5* (Eds. Bøg-Hansen, T. C., Spengler, G. A.) de Gruyter, W., Berlin, New York (in press)
- Schulte, B. A., Spicer, S. S.: Light microscopic histochemical detection of sugar residues in secretory glycoproteins of rodent and human tracheal glands with lectin-horseradish peroxidase conjugates and the galactose oxidase-schiff sequence. *J. Histochem. Cytochem.* 31, 391 - 403 (1983)
- Schulte, B. A., Spicer, S. S.: Light microscopic detection of sugar residues in glycoconjugates of salivary glands and the pancreas with lectin horseradish peroxidase conjugates II. *Rat. Histochem. J.* 16, 3 - 20 (1984)
- Spicer, S. S., Baron, D. A., Sato, A., Schulte, B. A.: Variability of cell surface glycoconjugates. Relation of differences in cell function. *J. Histochem. Cytochem.* 29, 994 - 1002 (1981)

- Stadler, B. M., Liechti, J., Bonnard, G. D.: T cell stimulating lectins are mitogen inducers but not mitogens. *Lectins Vol. 3*, 37 - 43 (Eds. Bøgg-Hansen, T. C., Spengler, G. A.) de Gruyter, W., Berlin, New York (1983)
- Stemberger, B. H., Walsh, R. M., Patton, S.: Morphometric evaluation of lipid droplet associations with secretory vesicles, mitochondria and other components in the lactating cell. *Cell Tiss. Res.* 236, 471 - 475 (1984)
- Vierbuchen, M., Klein, P. J., Uhlenbruck, G., Fischer, R.: Hormonabhängige Lektin-Bindungsstellen. I. Histochemischer Nachweis von Lektinbindungsstellen und ihre hormonelle Steuerung im Brustdrüsengewebe der Ratte. *Tumordiagnostik* 2, 235 - 239 (1981)
- Vierbuchen, M., Klein, P. J., Rösel, S., Fischer J., Uhlenbruck, G.: Endocrine therapeutic studies on carcinogen-induced rat mammary carcinomas characterized by hormone-dependent lectin-binding sites. *Lectins Vol. 3*, 145 - 155 (Eds. Bøgg-Hansen, T. C., Spengler G.A.) de Gruyter, W., Berlin, New York (1983)
- Walker, R. A.: The binding of peroxidase-labelled lectins to human breast epithelium. I Normal, hyperplastic and lactating breast. *J. Pathol.* 142, 279 - 291 (1984)
- Walker, R. A.: The binding of peroxidase-labelled lectins to human breast epithelium. II The reactivity of breast carcinomas to wheat germ agglutinin. *J. Pathol.* 144, 101 - 108 (1984)
- Walker, R. A.: The binding of peroxidase-labelled lectins to human breast epithelium. III Altered fucose-binding patterns of breast carcinomas and their significance. *J. Pathol.* 144, 109 - 117 (1984)
- Warburton, M. J., Mitchell, D., Ormerod, J., Rudland, P.: Distribution of myoepithelial cells and basement membrane proteins in the resting, pregnant, lactating and involuting rat mammary gland. *J. Histochem. Cytochem.* 30, 667 - 676 (1982)
- Welsch, U., Singh, S., Stemberger, B. H., Buchheim, W., Patton, S.: Ultrastructural changes in lactating tissue related to the suppression of milk secretion by concanavalin A. *Cell Tiss. Res.* 230, 527 - 541 (1983)
- Welsch, U., Singh, S., Buchheim, W., Patton, S.: Internalization of ferritin-concanavalin A by the lactating mammary cell in vivo. *Cell Tiss. Res.* 235, 433 - 438 (1984a)

- Welsch, U., Schumacher, U.: Histochemical observations on carbohydrates in connective tissue structures and basement membranes of hemi- and cephalochordates. *Acta Zoologica (Stockh.)* 65, 105 - 112 (1984b)
- Wieser, R., Brunner, G.: Imitation of contact inhibition by substrate-bound plasma membrane glycoproteins and lectins in serum-free hormone-supplemented cultures of GH₃ cells. *Exp. Cell. Res.* 147, 1, 23 - 30 (1983)
- Wooding, F. B. P.: The structure of the milk fat globule membrane. *J. Ultrastr. Res.* 37, 388 - 400 (1971)

DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. U. Welsch danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für seine wertvollen fachlichen Ratschläge bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K. Unsicker, Anatomisches Institut der Universität Marburg, gilt mein besonderer Dank für seine Hilfe beim Einstieg in die Methode der Zellkultur.

Weiter danke ich Frau Dr. I. Noske für ihre Ratschläge und Unterstützung bei den Zellkulturversuchen.

Nicht zuletzt möchte ich Frau B. Reyerman für ihre ausgezeichnete technische Hilfe bei den licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen, bei der Anfertigung der Bilder und der Vorbereitung des Manuskripts danken, sowie meiner Schwester für das Schreiben der Endfassung.

LEBENS LAUF

Am 8. Juli 1940 bin ich als Tochter des Lehrers Ferdinand Schinko und seiner Frau Maria Schinko, geb. Schlesinger, in Krummau an der Moldau geboren.

Nach unserer Aussiedlung besuchte ich von 1946 bis 1951 die Volksschule in Oberdorfen (Landkreis Erding). Von 1951 bis 1955 setzte ich meine schulische Ausbildung an der Oberrealschule in Mühlendorf am Inn fort und wechselte 1955 in das Realgymnasium der Luisenschule in München über, wo ich 1960 das Abitur ablegte.

Ab Wintersemester 1960/61 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München Experimentalphysik und schloß mein Studium am 14.12.1966 mit dem Diplom ab.

Seit 1.4.1967 bin ich als wissenschaftliche Angestellte der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität beschäftigt.

